



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Síntesis de carboxamidas bencimidazólicas y su
evaluación sobre la enzima triosafosfato
isomerasa de *Trypanosoma brucei* y
*Trypanosoma cruzi***

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

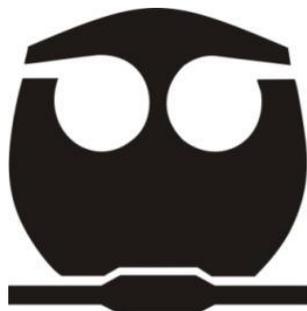
Paulina Flores Carrillo

Y QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA

Pedro García Peñaloza



MÉXICO, D.F.

Año 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	María Alicia Hernández Campos
VOCAL:	Francisco Hernández Luis
SECRETARIO:	Elena Guadalupe Ramírez López
1er. SUPLENTE:	Carlos Damián Zea
2° SUPLENTE:	Reina García Sánchez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Laboratorio 122, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de
Química, Universidad Nacional Autónoma de México**

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. María Alicia Hernández Campos

**SUPERVISOR TÉCNICO:
QFB. Pedro Josué Trejo Soto**

**SUSTENTANTES:
Paulina Flores Carrillo**

Pedro García Peñaloza

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento al proyecto 80093 y por la beca otorgada para la realización de ésta tesis.

Al personal de la USAI: Marisela Patricia Gutiérrez Franco, Rosa Isela del Villar Morales, Margarita Guzmán Villanueva, Georgina Duarte Lisci, Nayeli López Balbiaux y Víctor Hugo Lemus Neri por la asistencia técnica en la realización de los espectros de infrarrojo, resonancia magnética nuclear y masas.

Al Dr. Alfredo Téllez Valencia y su equipo por la realización de las pruebas de inhibición enzimática de los compuestos sintetizados.

A la Dra. Lilián Yépez Mulia y su equipo, por la determinación de las pruebas *in vitro* de los compuestos sintetizados.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Epidemiología de las tripanosomiasis	3
2.2.1. Tripanosomiasis americana	5
2.2.2. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
2.2.3. Tripanosomiasis africana humana	6
2.2.4. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma brucei</i>	6
2.2.5. Manifestaciones clínicas de la tripanosomiasis	7
2.3. Control y tratamiento de las tripanosomiasis.....	8
2.3.1. Bencimidazoles como fármacos antiparasitarios	10
2.4. Diseño de Fármacos	10
2.4.1. Acoplamiento Molecular (<i>docking</i>).....	11
2.5. Nuevas perspectivas en el desarrollo de agentes con actividad tripanocidas	12
2.6. Triosafosfato isomerasa como blanco para el desarrollo de nuevos fármacos tripanocidas.....	13
2.6.1. La interfaz de TIM como diana farmacológica en el desarrollo de nuevos fármacos.....	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	21
5.1. Objetivo General	21
5.2. Objetivos particulares.....	21
6. METODOLOGÍA	23
6.1. Parte Química	23
6.2. Parte Biológica	27
6.2.1. Prueba de determinación de la actividad enzimática de las enzimas TIM de <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Trypanosoma brucei</i>	27
6.2.2. Prueba de susceptibilidad <i>in vitro</i> para protozoarios	27
6.3 Parte Computacional.....	28
6.3.1. Obtención de las estructuras cristalográficas y minimización	28
6.3.2. Preparación de los ligandos.....	28

6.3.3. Preparación de la proteína.....	28
6.3.4. Acoplamiento molecular.....	29
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
7.1. Resultados parte química.....	30
7.1.1. Obtención del ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxílico (11)	37
7.1.2. Obtención de las carboxamidas finales PYP1, PYP2, PYP3, y PYP5.	40
7.1.3. Obtención de las carboxamidas finales PYP4 y PYP7.	43
7.2 Parte biológica.....	45
7.2.1. Ensayos de inhibición enzimática <i>in vitro</i> en la enzima Triosafosfato isomerasa	45
7.3. Parte computacional.....	49
7.3.1. Estudios de acoplamiento molecular (<i>docking</i>) de los compuestos de la serie PYP	49
8. CONCLUSIONES.....	53
REFERENCIAS	55
APÉNDICE I. PARTE EXPERIMENTAL	61
APÉNDICE II. ESPECTROS	73

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente las enfermedades parasitarias causadas por protozoarios y helmintos son uno de los principales problemas médico-sociales en el mundo, afectando principalmente a países en vías de desarrollo. Dentro de las enfermedades parasitarias, la Organización Mundial de la Salud ha catalogado a algunas de éstas como enfermedades tropicales desatendidas (*neglected tropical diseases*) debido a que proliferan en entornos empobrecidos y la inversión en el desarrollo de tratamientos eficaces es insuficiente. Además, han cobrado relevancia debido al incremento anual de casos de infección y a la mortalidad de algunas de ellas. De este conjunto de enfermedades desatendidas, entre las causadas por protozoarios con mayor impacto, se encuentra la tripanosomiasis americana que afecta a zonas de América latina y la tripanosomiasis africana humana que se encuentra en bastas zonas de África subsahariana.

La tripanosomiasis americana, también conocida como enfermedad de Chagas, es una enfermedad crónica y potencialmente mortal, cuyo agente etiológico es el protozoario *Trypanosoma cruzi* el cuales transmitido a los humanos en la mayoría de los casos por la picadura del artrópodo *Triatoma infestans*, comúnmente conocido como “chinche besucona”. La tripanosomiasis africana humana, conocida también como enfermedad del sueño, es una enfermedad sistémica causada por el protozoario *Trypanosoma brucei*, que es trasmitido a los humanos por la picadura de la mosca del género *Glossina*, también llamada coloquialmente mosca tse-tse. Ambas tripanosomiasis afectan la calidad de vida de los hospederos y en muchos casos pueden resultar mortales.

Si bien las zonas afectadas han adoptado campañas masivas de fumigación para prevenir la propagación del insecto vector no han sido del todo efectivas, por lo que la quimioterapia es la opción más viable para combatir estas enfermedades.

Desafortunadamente las opciones de tratamiento son reducidas debido a su estrecho índice terapéutico y poca eficacia, esto hace que la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas contra estas enfermedades, actualmente consideradas como incurables, sea imperativa.

Al tener mayor conocimiento del comportamiento bioquímico de los protozoarios causantes de estas enfermedades, los investigadores han encontrado nuevos blancos terapéuticos que junto al uso de herramientas computacionales, como el Diseño de Fármacos Asistido por Computadora, permiten la búsqueda de nuevos principios activos cuyas características

estructurales les confieran las propiedades terapéuticas esperadas tales como mayor especificidad, eficacia y menor toxicidad.

El propósito de este trabajo fue la síntesis de seis carboxamidas bencimidazólicas diseñadas por el método de acoplamiento molecular y su evaluación sobre la enzima triosafosfato isomerasa (TIM) de *Trypanosoma cruzi*; por estar relacionados filogenéticamente, también se determinó la actividad sobre la TIM de *Trypanosoma brucei*. Adicionalmente, se realizó un estudio de acoplamiento molecular con ambas enzimas y la del humano con el fin de determinar la afinidad y selectividad de los compuestos sintetizados, especialmente hacia la TIM de los protozoarios. También se probó la susceptibilidad de los protozoarios *E. histolytica*, *G. intestinales* y *T. vaginalis* a los compuestos sintetizados mediante ensayos *in vitro* con el propósito de evaluar el espectro de actividad biológica de las nuevas carboxamidas, que junto con otros estudios previos realizados por el grupo de investigación del Laboratorio 122, servirán para aumentar la base de datos y establecer relaciones estructura-actividad que permitan el diseño de nuevas moléculas apoyando a futuros proyectos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Epidemiología de las tripanosomiasis

El impacto global de las enfermedades parasitarias en el mundo es muy importante ya que inciden de manera drástica sobre la salud, la esperanza de vida y la productividad de millones de personas.¹ Las parasitosis están vinculadas a las condiciones climáticas, fenómenos demográficos y al desarrollo socioeconómico de las distintas regiones del planeta.²

Las infecciones parasitológicas representan uno de los eventos patológicos más prevalentes en los humanos y se estima que cerca de dos mil millones de personas, una tercera parte de la población mundial que en su mayoría viven en países subdesarrollados, alberga uno o más parásitos.³

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas tiene mayor incidencia en el continente americano. Actualmente se considera que es localmente transmitida en 19 países de este continente con un estimado de 8 a 15 millones de individuos infectados y una tasa de prevalencia de 1.45%. La población en riesgo ha sido reportada entre 25 y 109 millones de personas. Las estimaciones actuales sugieren que en México aproximadamente 2.1 millones de personas están infectadas.⁴⁻⁶ Para la población mexicana, poco más de 100 millones de habitantes, se estima una incidencia anual de 78,960 nuevas infecciones por año lo que equivale a 21.6 nuevos casos por día, esta incidencia se debe principalmente a la ausencia de intervenciones de control.⁷ Entre las serias complicaciones que esta enfermedad causa a personas infectadas está el desarrollo de cardiomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia y miocarditis de intensidad variable entre otras. Por lo que algunas de las acciones que se han realizado para prevenir oportunamente dicha enfermedad han sido para evitar la elevada propagación del insecto vector el cual trasmite el parásito; sin embargo, los esfuerzos no han sido del todo efectivos debido a las grandes zonas que deben ser fumigadas. Sumado a esto, algunos compuestos utilizados para tales fines a menudo suelen ser agresivos para las comunidades y el medio ambiente.⁸

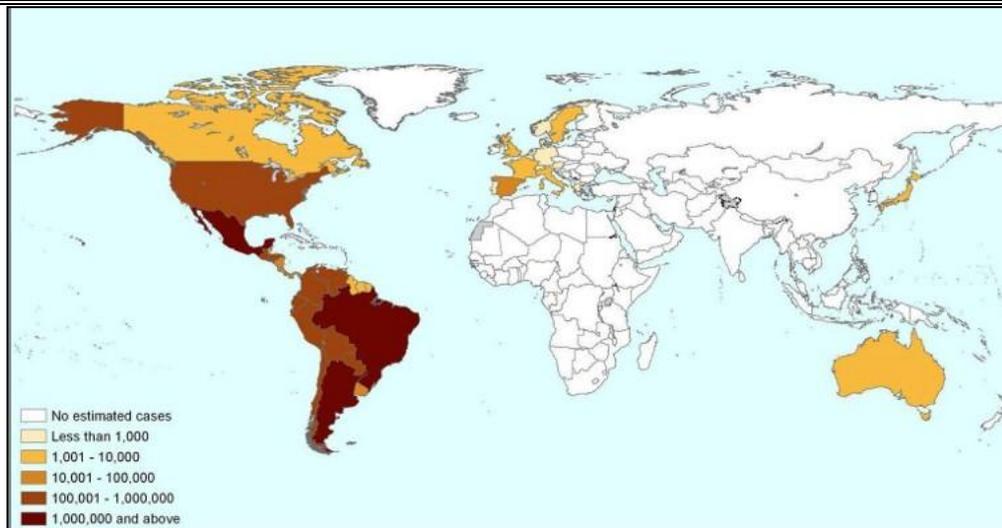


Figura 1. Distribución mundial de la enfermedad de Chagas. OMS, 2008.

En el caso de la tripanosomiasis africana, esta parasitosis actualmente se considera una enfermedad re-emergente y está incluida en el grupo de enfermedades olvidadas.⁹ Su distribución está generalizada en la zona de África subsahariana (**Fig. 2**). Se estima que el número de casos por año es de 17,500 y que la tasa acumulativa se establece entre 50,000 y 70,000 casos.¹⁰ Sin embargo, estos datos no reflejan la realidad de la situación debido a las condiciones de pobreza y sistemas de salud poco eficientes o inexistentes de esta región del continente.

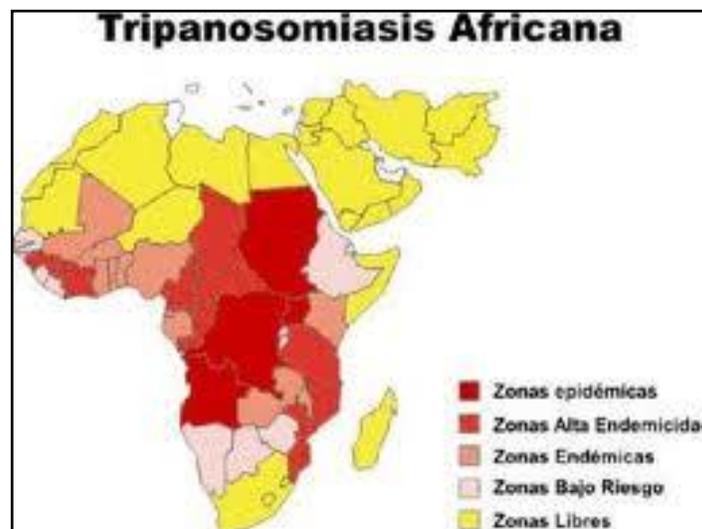


Figura 2. Distribución de la Tripanosomiasis en el continente Africano. OMS 2008

2.2.1. Tripanosomiasis americana

La tripanosomiasis americana es causada por el protozooario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* el cual tiene tres estadios morfológicos principales durante su ciclo biológico: tripomastigote, epimastigote y amastigote.¹¹⁻¹³ (Figura 3)

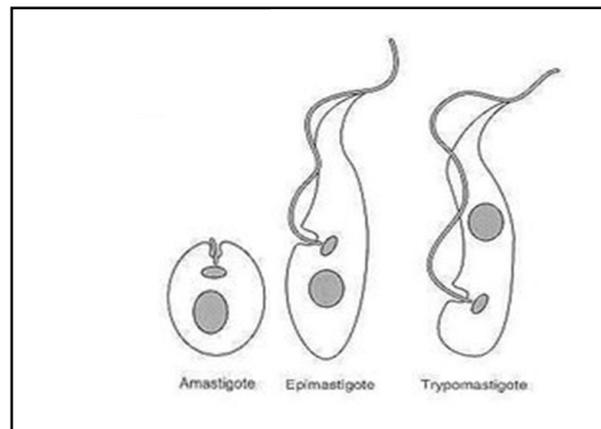


Figura 3. Representación de los cuatro estadios morfológicos de *T. cruzi*.

2.2.2. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

Etapas en el ser humano. El ciclo se inicia cuando el insecto hematófago *T. infestans* pica a un ser humano y defeca en la zona de la picadura, transmitiendo los *tripomastigotes metacíclicos* en las heces. Entran en el huésped a través de la herida o por el cruce de las membranas mucosas. Cuando entran en una célula humana se convierten en *amastigotes*, en esta etapa se multiplican por división binaria. Después de la multiplicación una gran cantidad de *amastigotes*, que se encuentran dentro de la célula infectada, pueden formar pseudoquistes. El *amastigote* se convierte nuevamente en *tripomastigote* y la célula es lisada por la cantidad de parásitos dentro. El *tripomastigote* pasa a torrente sanguíneo donde puede ser succionado por la picadura del triatomino.^{13,14}

Etapas en el insecto. Cuando el insecto pica a un hospedero infectado algunos *tripomastigotes* pasan a él a través de la sangre. En el intestino del insecto se transforman en *epimastigotes* los cuales constituyen una segunda etapa reproductiva. Después de la división a través de mitosis los *epimastigotes* pasan al recto, allí se convierten en *tripomastigotes*

metacíclicos y se evacúan a través de las heces. Las heces pueden infectar a un nuevo huésped repitiéndose el ciclo.^{13,14}

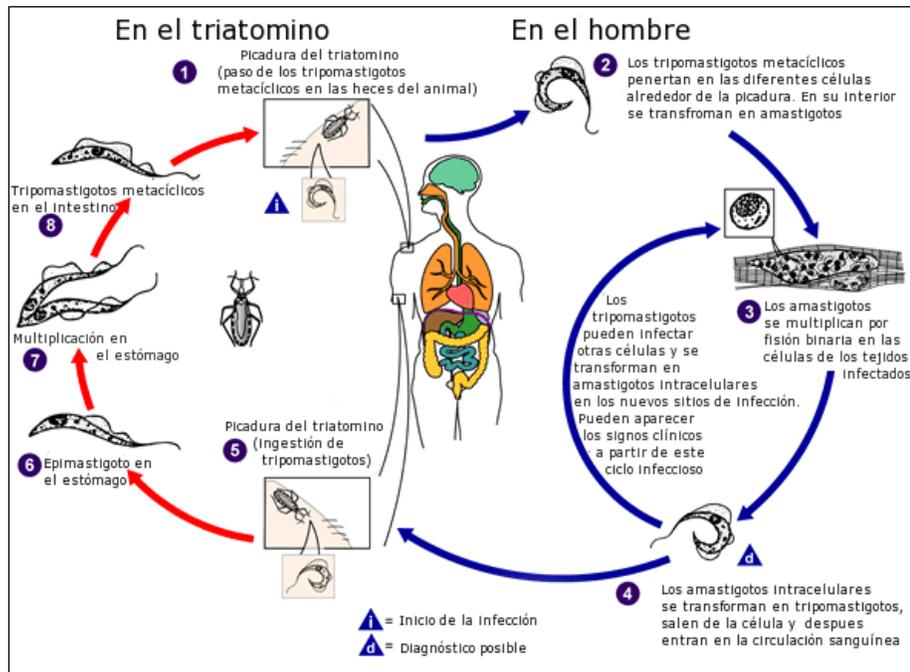


Figura 4. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* en humano y en el triatomo.

2.2.3. Tripanosomiasis africana humana

La tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño es causada por el protozoario *Trypanosoma brucei*, del cual se conocen dos subespecies: *T.b. rhodesiense* y *T.b. gambiense*. Este protozoario se puede encontrar en dos estadios principales: *epimastigote* y *tripomastigote*. A su vez, la forma *tripomastigote* se diferencia en cuatro subtipos: procíclico, metacíclico, esbelto y corto.¹⁵

2.2.4. Ciclo biológico de *Trypanosoma brucei*

En *T. brucei* y las subespecies parásitas del hombre hay un hospedero vertebrado el cual es el humano y un hospedero invertebrado siendo la mosca hematófaga del género *Glossina* conocida como tse-tse, la cual constituye el vector de la enfermedad.¹⁵ En la **Figura 5** podemos ver representado el ciclo biológico.

Etapas en el ser humano. La mosca tse-tse pica al hospedero e inyecta *tripomastigotes* metacíclicos; éstos se transforman en *tripomastigotes* sanguíneos esbeltos y se multiplican en varios fluidos del cuerpo; algunos se transforman en *tripomastigotes* sanguíneos cortos pre-adaptados a la mosca tse-tse.¹⁵

Etapas en la mosca tse-tse. Cuando una mosca pica a un hospedero infectado los *tripomastigotes* cortos pasan al intestino de la mosca donde se transforman en *tripomastigotes* procíclicos y se multiplican por fisión binaria, entonces abandonan el intestino y se convierten en *epimastigotes*; éstos se multiplican en las glándulas salivares transformándose en *tripomastigotes* metacíclicos. El ciclo se completa cuando una mosca inyecta al hospedero vertebrado los *tripomastigotes* metacíclicos.¹⁵

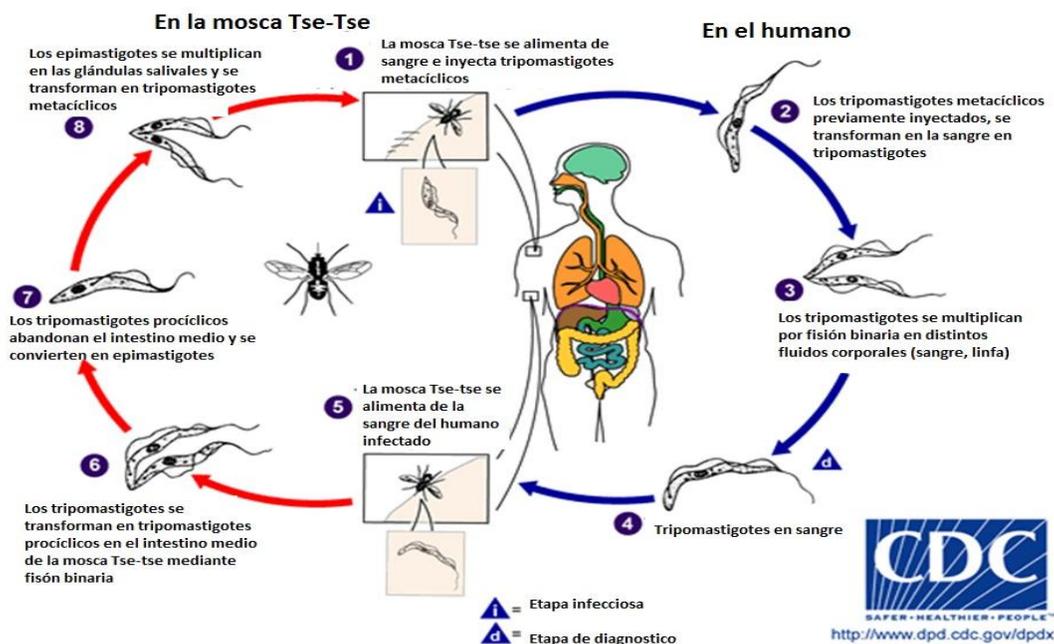


Figura 5. Ciclo biológico de *Trypanosoma brucei* en humano y la mosca tse-tse.

2.2.5. Manifestaciones clínicas de la tripanosomiasis

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas posee tres fases clínicas: fase aguda, fase indeterminada y fase crónica. La fase aguda de la enfermedad suele pasar desapercibida debido a la ausencia de síntomas específicos, siendo diagnosticado

aproximadamente solo el 7% de los casos; el signo de Romaña es el evento clásico de esta fase que consiste en edema indoloro del tejido palpebral y periocular. En la fase indeterminada el parásito se encuentra multiplicándose dentro de las células del huésped sin algún síntoma evidente. La fase crónica de la enfermedad aparece años después y se manifiesta con la aparición de síntomas conocidos como: megacardias, megaesófago y megacolon que consisten en el agrandamiento de dichos órganos afectando la calidad de vida de los pacientes y en muchos casos llevar a la muerte.^{11, 12}

Para el caso de la tripanosomiasis africana, esta enfermedad también puede clasificarse en etapas aguda y crónica según las manifestaciones clínicas del proceso patológico. En la etapa aguda, después de la inoculación, los parásitos proliferan en el lugar de la infección produciendo un nódulo inflamatorio llamado chancro tripanosomal. Los parásitos se extienden por el torrente sanguíneo a través del sistema linfático iniciándose el estadio hemolinfático de la enfermedad. Durante esta etapa la sintomatología es bastante inespecífica y variable presentándose malestar general, dolor de cabeza y fiebre intermitente. En la etapa crónica de la infección el parásito invade los órganos internos, incluyendo el sistema nervioso central. A medida que avanza la etapa crónica los dolores de cabeza se intensifican y aparecen desórdenes del sueño, causado por la alteración del ritmo circadiano normal. También se presentan alteraciones manifiestas del comportamiento, convulsiones, dificultad para caminar y para hablar, somnolencia, meningoencefalitis y por último la muerte.^{16, 17}

2.3. Control y tratamiento de las tripanosomiasis

Actualmente no se cuenta con una vacuna o un tratamiento específico disponible, así que las acciones encaminadas al control de la enfermedad residen en la eliminación de los insectos que fungen como vectores transmisores de este padecimiento.¹⁸ A pesar de los esfuerzos por implementar medidas preventivas, éstas no han sido del todo efectivas, por lo que la quimioterapia sigue siendo la mejor vía de tratar estas parasitosis.

Ambas tripanosomiasis están dentro del grupo de las enfermedades desatendidas, debido a que existe poca inversión en el desarrollo de fármacos tripanocidas. Por otra parte, prácticamente todos los fármacos que se conocen para tratar dichas enfermedades han sido discontinuados debido a su ineffectividad o efectos adversos. En la **Tabla 1** se muestran el

mecanismo de acción y los efectos adversos frecuentes de los fármacos utilizados en el tratamiento de las tripanosomiasis.

Tabla 1. Mecanismo de acción y efectos adversos de los fármacos utilizados en el tratamiento de la tripanosomiasis

Trypanosoma	Fármaco	Mecanismo de acción	Efectos adversos
<i>T. cruzi</i>	nifurtimox	Formación de radicales libres intracelulares que provocan la muerte del protozooario. ^{21,22}	Pérdida de peso, alteraciones psiquiátricas e irritabilidad. ^{19,20}
<i>T. cruzi</i>	benznidazol	Formación de radicales libres intracelulares que provocan la muerte del protozooario. ^{21,22}	Hipersensibilidad, trombocitopenia, polineuropatía, polineuritis de nervios periféricos y parestesias. ^{19,20}
<i>T. brucei</i>	pentamidina	Se une a fosfolípidos y ácidos nucleicos perturbando la estructura del ADN. ^{25,26}	Hipotensión severa, daño hepático, renal y pancreático específicamente afectando las células beta productoras de insulina. ^{23,24}
<i>T. brucei</i>	suramina	Altera el desarrollo completo del flagelo en el protozooario llevándolo a la muerte. ^{27, 28}	Náuseas, vómito intenso, daño hepático, dermatitis, anemia grave, diarrea y es fatal para el feto. ^{23, 24}
<i>T. brucei</i>	eflortidina	Inhibe reversiblemente a la ornitina descarboxilasa teniendo como consecuencia alteraciones en la diferenciación del protozooario llevándolo a la muerte. ^{29,30}	Náuseas, vómito, diarrea, daño hepático y linfocitopenia. ^{23,24}

2.3.1. Bencimidazoles como fármacos antiparasitarios

El núcleo de bencimidazol se considera una estructura privilegiada puesto que posee características químicas que favorecen su efecto a nivel biológico. El desarrollo de bencimidazoles como fármacos antihelmínticos inicio en 1961 cuando Brown descubrió el tiabendazol y su uso en el tratamiento de parásitos gastrointestinales. A partir del tiabendazol se sintetizaron nuevos compuestos de mayor espectro y potencia, entre los cuales se encuentran los derivados del 1*H*-bencimidazol-2-il carbamato de metilo como el albendazol y mebendazol que tienen actividad contra algunos protozoarios tales como *G. intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*.³¹ Adicionalmente, los derivados del bencimidazol han mostrado actividad contra otros protozoarios como *T. cruzi* y *L. mexicana*³², por lo que es de suma importancia continuar con la investigación encaminada a la búsqueda de nuevos agentes antiprotozoarios derivados del bencimidazol.

2.4. Diseño de Fármacos

El diseño racional de un fármaco puede llevarse a cabo usando diferentes estrategias. Una de las más recientes y en creciente desarrollo es el uso de diversos métodos computacionales, lo que se conoce como el diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC).³³

El DiFAC es una estrategia del diseño racional de fármacos que se enfoca en la búsqueda y la optimización de nuevos compuestos líderes con una actividad biológica específica. Cuenta con el uso de diversos métodos computacionales para relacionar la actividad biológica de un compuesto con su estructura. El DiFAC no es un método directo para obtener nuevos fármacos; por lo tanto debe partir de algún tipo de información experimental.

Los métodos del DiFAC pueden agruparse en dos categorías: métodos basados en el ligando cuando se conoce la estructura y la actividad de una serie de moléculas pero se desconoce el sitio receptor y métodos basados en el receptor. Cuando se conoce la estructura tridimensional del receptor el método se conoce como acoplamiento molecular o *docking*.

2.4.1. Acoplamiento Molecular (*docking*)

El acoplamiento molecular (*docking*) es una técnica computacional que permite predecir la conformación y orientación de un ligando en una macromolécula o blanco biológico. Esta técnica se emplea cuando la estructura de la macromolécula-receptor es conocida, usualmente a partir de estudios de cristalografía de rayos X o por resonancia magnética nuclear (RMN). El acoplamiento molecular nos permite examinar los requerimientos estructurales de un ligando para predecir la orientación más estable dentro un sitio de unión.³⁴ Esto se realiza mediante la exploración del espacio conformacional del ligando, así como en la discriminación entre los diferentes modos de unión que puede adoptar un ligando en la macromolécula, para finalmente estimar la energía de unión con el receptor. La energía de unión del complejo ligando-receptor se expresa en términos termodinámicos como energía libre de Gibbs de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) y considera factores estéricos, electrostáticos, rigidez de la macromolécula, formación de puentes de hidrógeno, así como energía de solvatación y factores entrópicos rotacionales y traslacionales.^{35,36}

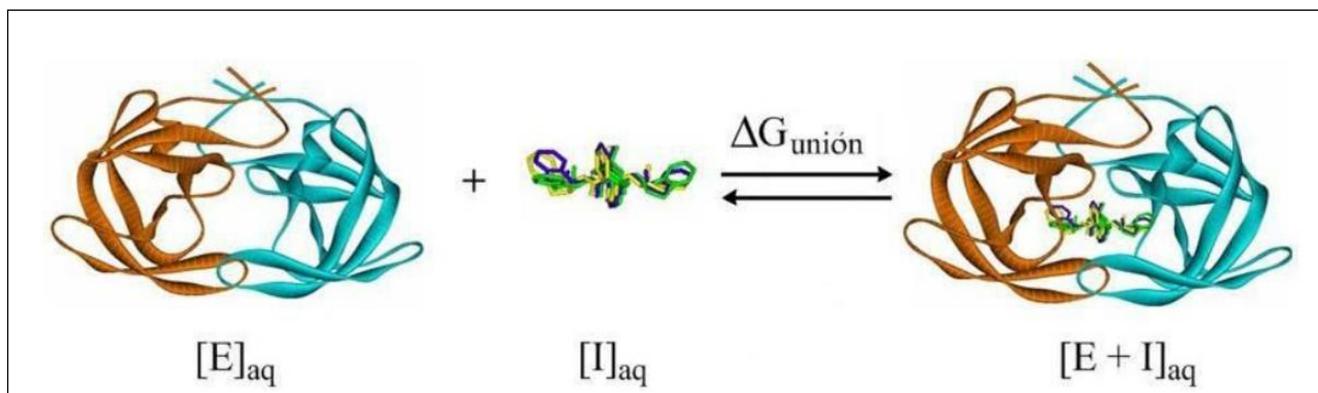


Figura 6. Ejemplificación de la metodología de *docking*

El procedimiento más empleado en este método consiste básicamente en tres pasos: representación del sistema en el espacio por medio de mallas (*grid*) que contienen la información de la contribución energética del receptor para la unión del ligando; la búsqueda del espacio conformacional accesible al ligando y la evaluación de las soluciones obtenidas por medio de funciones de evaluación. Éstas permiten calcular un puntaje, por ejemplo la energía libre de unión del complejo formado.^{37.}

En el caso del programa Autodock la energía de unión se describe en términos aditivos de varios componentes que contribuyen a la energía de formación del complejo ligando-receptor, como se muestra en la siguiente ecuación.

$$\Delta G_{\text{unión}} = \Delta G_{\text{disolvente}} + \Delta G_{\text{conformación}} + \Delta G_{\text{interacción}} + \Delta G_{\text{rotación}} + \Delta G_{\text{t/r}} + \Delta G_{\text{vibración}}$$

Donde:

- $\Delta G_{\text{disolvente}}$ es la contribución debida a efectos del disolvente como interacciones disolvente-ligando, disolvente-proteína y disolvente-complejo ligando-receptor.
- $\Delta G_{\text{conformación}}$ es la energía debida a cambios conformacionales en la proteína y el ligando.
- $\Delta G_{\text{interacción}}$ es la energía libre asociada a las interacciones ligando-receptor.
- $\Delta G_{\text{rotación}}$ es la pérdida de energía asociada a la pérdida de grados de libertad de rotación interna de la proteína y el ligando.
- $\Delta G_{\text{t/r}}$ es la pérdida energética traslacional y rotacional debida a la asociación de dos moléculas.
- $\Delta G_{\text{vibración}}$ corresponde a los cambios de energía libre debido a cambios en los modos vibracionales.

La técnica de acoplamiento molecular ha adquirido relevancia en la búsqueda de nuevas moléculas, ya que se pueden evaluar millones de compuestos *in silico* obteniendo *hits* computacionales, esta evaluación se conoce como *virtual screening*,³⁸ de esta manera se pueden obtener compuestos que puedan ser candidatos a pruebas subsecuentes.

2.5. Nuevas perspectivas en el desarrollo de agentes con actividad tripanocidas

Actualmente numerosos grupos de investigación se han dado a la tarea de encontrar dianas o blancos terapéuticos atractivos para el desarrollo de nuevos fármacos, en específico de las vías metabólicas, para erradicar estas enfermedades.³⁹⁻⁴¹

Al ser organismos filogenéticamente cercanos *T. cruzi* y *T. brucei* comparten numerosos blancos terapéuticos importantes desde el punto de vista de diseño de fármacos como lo es la síntesis de esteroides,⁴² síntesis y metabolismo de la tripanotona⁴³ y la vía glucolítica.⁴⁴ En

esta última vía metabólica, el reto consiste en inhibir enzimas específicas, ya que estos protozoarios dependen en gran medida de esta vía para la obtención de energía.

2.6. Triosafosfato isomerasa como blanco para el desarrollo de nuevos fármacos tripanocidas

Una de las enzimas de mayor interés, en la última década, para el desarrollo de nuevos agentes tripanocidas es la triosafosfatoisomerasa (TIM).⁴⁵ Esta enzima cataliza la interconversión reversible entre el gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato en la ruta glucolítica⁴⁶ (**Figura 7**). Esta interconversión la realiza sin el requerimiento de cofactores para llevar a cabo la catálisis. La inhibición de la TIM tiene como consecuencia la acumulación de dihidroxiacetona fosfato que podría inhibir la aldolasa, o bien podría ser convertida espontáneamente a metilgloxal que es un compuesto altamente tóxico para los parásitos. Adicionalmente, la inhibición de la TIM provoca que el tripanosoma se vea obligado a obtener energía por la vía anaeróbica, obteniendo menor cantidad de ATP llevándolo a la muerte.⁴⁷

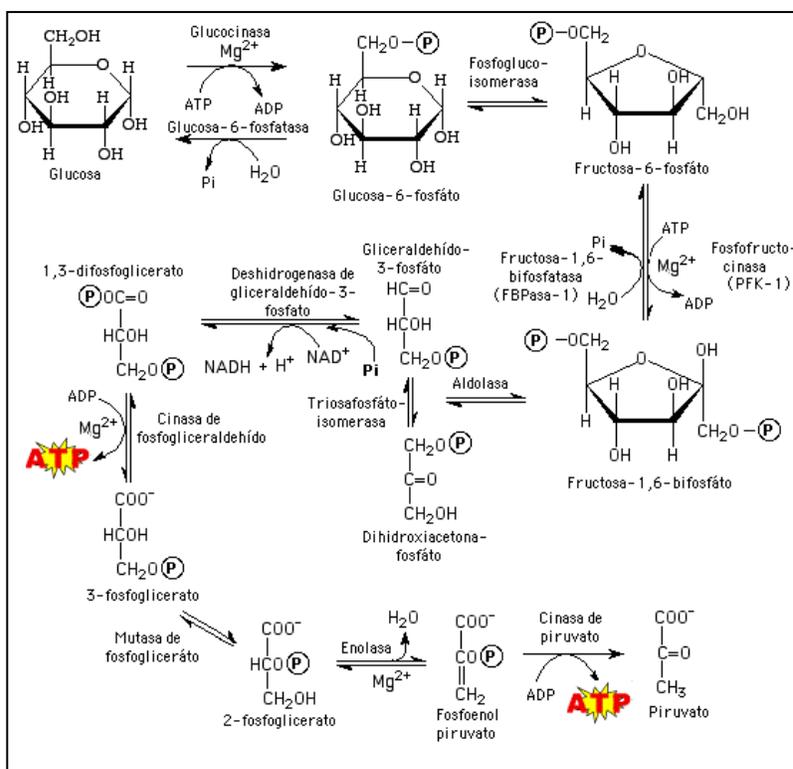


Figura 7. Diagrama de la glucólisis.

La TIM ha sido identificada en todas las especies analizadas hasta la fecha conociéndose la secuencia de aminoácidos de más de 100 especies y la estructura tridimensional de 17 de ellas. Esta enzima además de participar en la glucólisis interviene en la gluconeogénesis y en la síntesis de triglicéridos. La TIM es un homodímero de 54.2 kDa,⁴⁸ cada monómero está constituido por 251 residuos de aminoácidos que adoptan un plegamiento de barril (α / β)₈, las ocho hebras forman una hoja β paralela cilíndrica constituyendo la parte interna del barril rodeada a su vez de ocho hélices α .⁴⁹ El sitio activo se encuentra en uno de los extremos del barril, en la cavidad formada por las asas contiguas al extremo N-terminal de las hebras β .⁵⁰ Aunque cada monómero tiene un sitio activo experimentalmente se ha observado que la TIM es activa únicamente en su forma dimérica, por lo que se cree que la desestabilización de la estructura dimérica repercutiría en la funcionalidad de la enzima.⁵¹

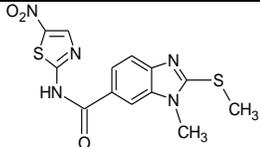
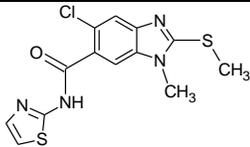
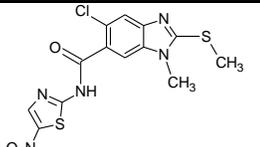
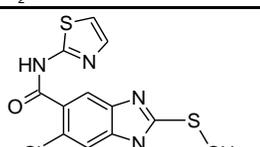
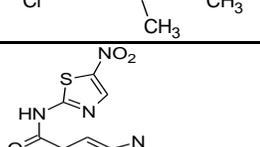
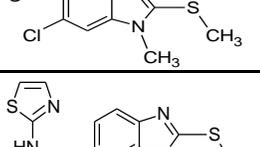
2.6.1. La interfaz de TIM como diana farmacológica en el desarrollo de nuevos fármacos

Puesto que la TIM está presente tanto en los seres humanos (HsTIM) como en el parásito, es de suma importancia identificar las regiones o residuos de aminoácidos que presentan diferencias entre especies, con el objetivo de desarrollar fármacos selectivos.⁵² Debido a que el sitio activo de la TIM se encuentra altamente conservado en el protozario y en el humano no es conveniente diseñar inhibidores, ya que es muy posible que el ser humano resulte afectado. Por otra parte, la identidad de los aminoácidos de la interfaz del dímero entre las HsTIM y TcTIM es del 52%, por lo que esta diferencia es interesante para el desarrollo de fármacos selectivos.

Para inhibir a las TIM's de los protozoarios también se ha propuesto un sitio de control alostérico, el cual es extremadamente hidrofóbico y se localiza en la interfaz homodimérica.⁵³ Con esta información, numerosos grupos de investigación han trabajado en encontrar compuestos selectivos en la inhibición de TbTIM y TcTIM entre estos compuestos destacan los sistemas heterocíclicos aromáticos como los dióxidos de fenazinas, tiadiazinas, tiazoles y benzotiazoles.⁵⁴⁻⁵⁶

En nuestro grupo de investigación se evaluó experimentalmente el efecto de 45 compuestos, todos derivados del bencimidazol, sobre la actividad de la TcTIM a concentración de 100 μM .⁵² Los resultados de esta evaluación permitieron estudiar de manera computacional la forma en que los compuestos activos interactúan con la enzima TcTIM (**Tabla 2**).

Tabla 2. Porcentaje de inhibición y energía de unión de algunos compuestos evaluados sobre TcTIM⁵²

Clave	Estructura	% actividad inhibitoria TcTIM (100 μM)	$\Delta G_{\text{unión TcTIM}}$ (kcal/mol)
1		10	-6.78
2		7	-6.14
3		29	-6.83
CMC-17		40	-5.85
CMC-19		50	-6.74
6		8	-7.13

Los resultados muestran que las carboxamidas **CMC17** y **CMC19** presentaron el mayor porcentaje de inhibición enzimática sobre la TcTIM. Estas moléculas tienen características importantes como sistemas heterocíclicos aromáticos en su estructura que permiten la interacción con los residuos aromáticos presentes en la interfaz; además de un conector entre el bencimidazol y el tiazol de tipo amida, el cual confiere rigidez a las moléculas y permite formar puentes de hidrógeno. Los resultados experimentales reportados muestran que el compuesto **CMC19**, el cual posee en su estructura un anillo de nitrotiazol, presentó el mejor porcentaje de inhibición dentro de la serie análoga. También los valores de energía resultados de un estudio de *docking* mostraron que este compuesto presentó mayor afinidad por la enzima que su análogo no nitrado **CMC17**.⁵⁶ Esto se debe a que el grupo nitro presente en el compuesto **CMC19** puede formar de puentes de hidrógeno con los residuos presentes en la enzima.

A partir de este estudio se propuso el diseño de nuevos compuestos inhibidores de la TcTIM con el fin de establecer la importancia que presenta el nitrotiazol en la unión con la enzima. Para esto se reemplazó el anillo de tiazol por otro tipo de heterociclos tales como piridina o furano; así mismo, para determinar la importancia que tiene el grupo nitro en la unión se sustituyó por grupos como metilo o cloro.

Por otra parte, también se modificó el sistema heterocíclico aromático por un grupo *tert*-butilo, grupo voluminoso pero no aromático, para evaluar la relevancia de un sistema aromático en la actividad inhibitoria. En la **Tabla 3** se muestran las estructuras de los compuestos diseñados y su energía de unión.

Tabla 3. Energía de unión de los compuestos de la serie **PYP** y análogos de importancia con la TIM de *T. cruzi*

Código	Estructuras	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)
		TcTIM
PYP1		-7.03
PYP2		-7.10
PYP3		-7.14
PYP4		-6.57
PYP5		-7.07
PYP7		-8.95
CMC17		-7.51
CMC19		-7.72

Los resultados de energía de unión de la serie **PYP**, diseñada a partir de las modificaciones del compuesto líder **CMC19**, muestran que las moléculas interactúan de manera favorable y con buenos resultados de energía de unión. Por lo que son candidatos interesantes para llevar a cabo su síntesis y evaluar su potencial como inhibidores de la TIM.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tripanosomiasis americana y la tripanosomiasis africana humana son enfermedades que causan un gran impacto a la población de los continentes americano y africano. Actualmente se dispone de escasas opciones farmacológicas útiles en el manejo óptimo de estas enfermedades. Por ello es de vital importancia el desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos que posean baja toxicidad y cuya eficacia tenga un efecto significativo en la mejoría de los pacientes, así como en la reducción de las tasas de morbilidad y mortalidad relacionadas a las patologías que estas dos infecciones presentan.

Estos fármacos pueden ser diseñados mediante técnicas como el Diseño de Fármacos Asistido por Computadora (DiFAC), la cual es una herramienta utilizada frecuentemente en las últimas décadas. Dentro de las metodologías empleadas por el DiFAC se encuentra el acoplamiento molecular o *docking*, que permite el diseño de diversas moléculas para la inhibición de enzimas o inactivación de las funciones de algunas proteínas consideradas como blancos o dianas farmacológicas. Uno de estos blancos puede ser la triosafosfato isomerasa (TIM), enzima presente en la vía glucolítica de protozoarios, que con su inhibición llevaría a la muerte del parásito.

En nuestro grupo de investigación se han evaluado diversas moléculas derivadas del bencimidazol como inhibidoras de la TIM de protozoarios, por lo que se tiene información recabada sobre ciertos requerimientos estructurales necesarios para la inhibición de la enzima. Con esta información se diseñaron seis carboxamidas análogas de la serie CMC, que son moléculas híbridas entre un nitrotiazol y un bencimidazol, como posibles inhibidores de la TIM de *T. cruzi*. De estas carboxamidas, 4 poseen un núcleo de piridina sustituido, en lugar del nitrotiazol, y un sistema alifático voluminoso. Con base en ello se plantearon las siguientes preguntas:

- ¿Los compuestos diseñados, que son análogos de compuestos que mostraron una buena inhibición de TcTIM, tendrán actividad inhibitoria de la TcTIM?
- ¿La introducción de nuevos sistemas aromáticos heterocíclicos en la posición 5 del bencimidazol proveerá mayor o menor inhibición sobre la TIM?
- ¿La introducción de un sistema no aromático, pero con características hidrofóbicas, brindará mayor o menor inhibición sobre la TIM?

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

-¿Los compuestos diseñados para inhibir la TcTIM también afectarán la actividad de la TIM de *T. brucei*?

-¿Existirá relación entre las afinidades calculadas por el *docking* con las actividades encontradas en el ensayo enzimático?

-¿Será posible que los nuevos compuestos diseñados, al ser derivados bencimidazólicos, posean actividad contra otros protozoarios como *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis* en evaluaciones *in vitro*?

4. HIPÓTESIS

Si la serie de carboxamidas **PYP** se diseñó mediante acoplamiento molecular, utilizando para esto las estructuras tridimensionales de las TIM de *T. cruzi* y moléculas con actividad inhibitoria comprobada, entonces dichos compuestos análogos tendrán actividad inhibitoria sobre TcTIM en ensayos de inhibición enzimática. Debido a la homología secuencial y la semejanza estructural que tiene la TIM de *T. brucei* con la TcTIM, estudios de *docking* en esta enzima mostrarán valores semejantes a los obtenidos para la TcTIM, por lo que también en ensayos de inhibición los compuestos diseñados mostrarán actividad inhibitoria sobre esta enzima.

Por otra parte, se espera que en estudios teóricos de *docking*, los compuestos presenten selectividad por la TIM de los protozoarios *T. cruzi* y *T. brucei* en comparación con la TIM de humano.

Los compuestos con las mejores energías de afinidad, serán los compuestos más activo efectivos en los ensayo enzimáticos.

Además, debido a la similitud estructural que tiene la serie **PYP** con otros compuestos previamente sintetizados y que mostraron actividad contra *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, y *Trichomonas vaginalis* la serie sintetizada en este trabajo mostrará actividad contra estos protozoarios.

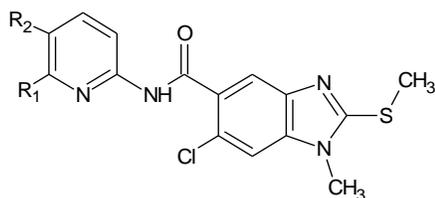
5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Sintetizar y evaluar seis carboxamidas bencimidazólicas, designadas como **PYP1**, **PYP2**, **PYP3**, **PYP4**, **PYP5** y **PYP7**, diseñadas por estudios de acoplamiento molecular como inhibidores de la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*.

5.2. Objetivos particulares

- Sintetizar las carboxamidas bencimidazólicas **PYP1**, **PYP2**, **PYP3**, **PYP4**, **PYP5** y **PYP7**

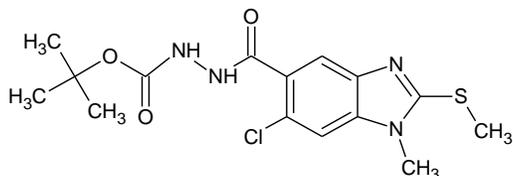


PYP1=R₁=H, R₂=H

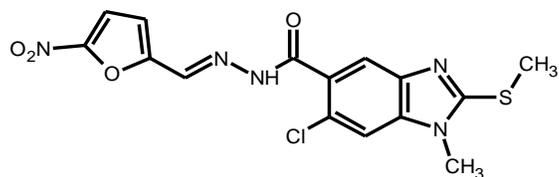
PYP2= R₁=CH₃, R₂=H

PYP3= R₁=Cl, R₂=H

PYP5= R₁=H, R₂=NO₂



PYP4



PYP7

- Determinar las constantes físicas y caracterizar estructuralmente los compuestos finales mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

- Realizar un estudio de acoplamiento molecular para determinar la afinidad de los compuestos de la serie **PYP** con las TIM's de *T. cruzi*, *T. brucei* y *H. sapiens*.
- Evaluar la actividad inhibitoria de las carboxamidas sobre las enzimas TcTIM y TbTIM.
- Estudiar, mediante *docking*, el modo de interacción de los compuestos sobre las enzimas TcTIM y TbTIM.
- Determinar si los datos obtenidos con el estudio de *docking* correlacionan adecuadamente con los resultados de inhibición enzimática sobre la TbTIM y TcTIM de los compuestos sintetizados.
- Evaluar la actividad antiprotozoaria de las carboxamidas sintetizadas contra *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis* mediante ensayos *in vitro*.
- Enriquecer la base de datos de compuestos antiparasitarios derivados del bencimidazol, con la finalidad de establecer relaciones estructura-actividad que permitan el diseño de futuros compuestos antiprotozoarios.

6. METODOLOGÍA

El trabajo realizado en esta tesis se divide en tres secciones: parte química, parte biológica y parte computacional. La parte química se llevó a cabo en el laboratorio 122 del departamento de farmacia de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la tutoría de la M. en C. María Alicia Campos Hernández y la asesoría del QFB. Pedro Trejo Soto. La parte de inhibición enzimática se realizó en el Centro de Investigación en Alimentos y Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad Juárez en el Estado de Durango, bajo la supervisión del Dr. Alfredo Téllez Valencia; mientras que la parte de evaluación biológica de los compuestos finales se realizó en el Hospital de Pediatría, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Siglo XXI, bajo la supervisión de la Dra. Lilián Yépez Mulia. La parte computacional se realizó de igual manera en el laboratorio 122 de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la supervisión del QFB. Rodrigo Aguayo Ortíz.

6.1. Parte Química

El desarrollo experimental para la síntesis de las carboxamidas bencimidazólicas se dividió en tres secciones.

- a) Síntesis del intermediario común ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**11**)
- b) Síntesis de las carboxamidas:
 - 6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-*N*-(piridin-2-il)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**PYP1**)
 - 6-Cloro-1-metil-*N*-(6-metilpiridin-2-il)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**PYP2**)
 - 6-Cloro-*N*-(6-cloropiridin-2-il)-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**PYP3**)
 - 6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-*N*-(5-nitropiridin-2-il)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**PYP5**)

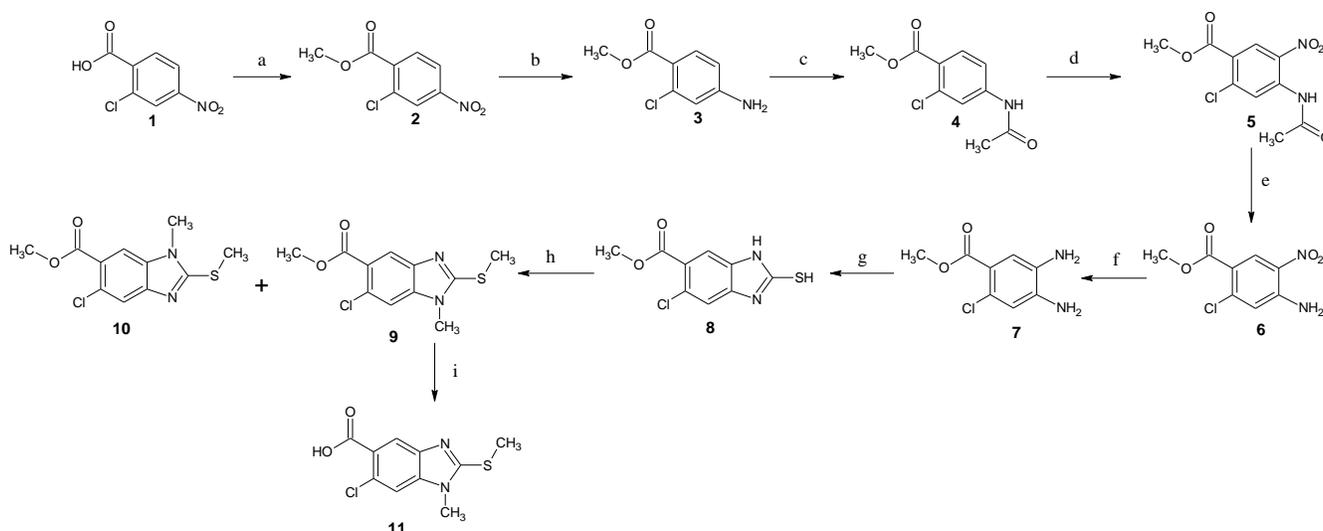
c) Síntesis de las carboxamidas:

- 2-[[6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-il]carbonil]hidrazinocarboxilato de *tert*-butilo (**PYP4**)
- 6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-*N*-[(5-nitrofuran-2-il)metilen]-1*H*-bencimidazol-5-carboxihídrica (**PYP7**).

a) Síntesis del intermediario ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**11**)

La primera etapa del desarrollo experimental consistió en la síntesis del ácido carboxílico, intermediario **11**, el cual se utilizó como precursor común para los compuestos finales y su secuencia sintética se muestra en el **Esquema 1**.

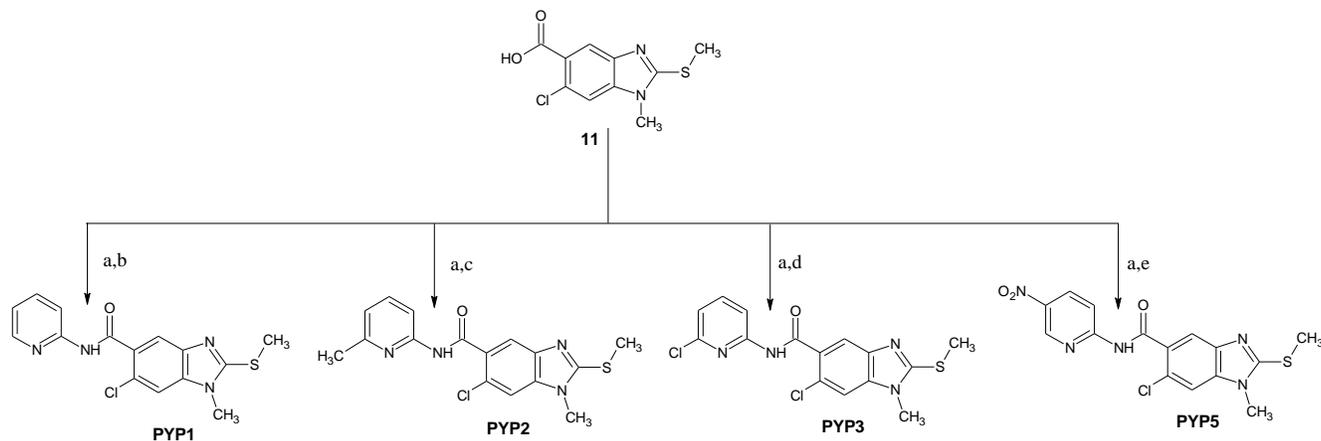
Para obtener el intermediario **11** se partió del ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico comercial (**1**), el cual se esterificó con sulfato de dimetilo en medio básico para dar el 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (**2**). La reducción catalítica de (**2**) llevó a la obtención del 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (**3**). Este compuesto se acetiló inmediatamente con anhídrido acético para obtener al compuesto 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (**4**), al cual se le efectuó una reacción de nitración usando mezcla sulfonítrica a bajas temperaturas (0-5°C) para dar el 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**5**). Posteriormente, el grupo acetamido de (**5**) se hidrolizó en condiciones ácidas de metanol y ácido sulfúrico dando el 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**6**). La reducción catalítica del grupo nitro de este compuesto generó el 4,5-diamino-2-clorobenzoato de metilo (**7**), que inmediatamente se ciclocondensó con disulfuro de carbono y etanol en medio básico para dar el 2-mercapto-6-cloro-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**8**). Este compuesto se trató con exceso de CH₃I en medio básico lo que generó la mezcla de isómeros: 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**9**) y 5-cloro-1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**10**). Los isómeros se separaron por cromatografía en columna flash aislando el isómero de interés **9**, el cual se sometió a hidrólisis básica para dar el ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**11**), intermediario requerido para la síntesis de los compuestos finales.



Esquema 1. Secuencia de síntesis para la obtención del compuesto ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**11**). Reactivos y condiciones: (a) $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, NaHCO_3 , DMF, calor; (b) H_2 , Ni-Raney, MeOH; (c) Ac_2O ; (d) $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ 0-5°C; (e) $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$; (f) H_2 , Ni-Raney, MeOH/AcOEt; (g) CS_2 , EtOH, H_2O , KOH, calor; (h) 2 eq. CH_3I , KOH, EtOH/ H_2O ; (i) KOH, MeOH

b) Síntesis de las carboxamidas PYP1, PYP2, PYP3 y PYP5

Para la síntesis de estas cuatro carboxamidas se siguió la ruta sintética del **Esquema 2**. Se partió del compuesto **11**, el cual se trató con cloruro de tionilo en exceso, obteniendo de esta manera, y sin aislamiento, el cloruro de 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carbonilo. El posterior tratamiento del cloruro de ácido, en el mismo matraz de reacción, con 2-aminopiridina permitió obtener el compuesto 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-*N*-(piridin-2-il)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**PYP1**), con 2-amino-6-metilpiridina al 6-cloro-1-metil-*N*-(6-metilpiridin-2-il)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**PYP2**), con 2-amino-6-cloropiridina al 6-cloro-*N*-(6-cloropiridin-2-il)-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**PYP3**) y finalmente con 2-amino-5-nitropiridina permitió la obtención de 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-*N*-(5-nitropiridin-2-il)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**PYP5**).

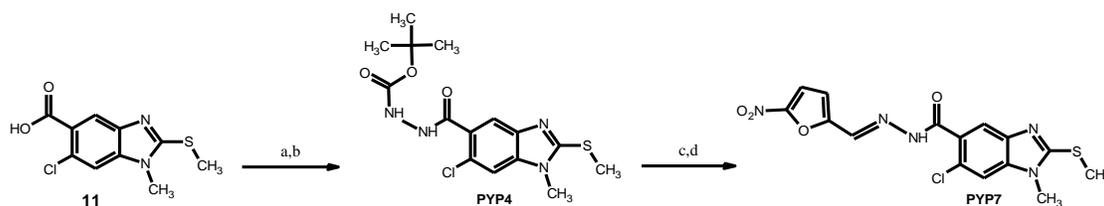


Esquema 2. Secuencia de síntesis para la obtención de **PYP1**, **PYP2**, **PYP3** y **PYP5**. Reactivos y condiciones: (a) 6 eq. SOCl_2 , calor; (b) 2-aminopiridina, CH_3CN , Et_3N ; (c) 2-amino-6-metilpiridina, CH_3CN , Et_3N ; (d) 2-amino-6-cloropiridina, CH_3CN , Et_3N ; (e) 2-amino-5-nitropiridina, CH_3CN , Et_3N .

c) Síntesis de las carboxamidas **PYP4** y **PYP7**

Para la síntesis de estas dos carboxamidas se siguió la ruta sintética mostrada en el **Esquema 3**. Nuevamente se partió del ácido **11**, el cual se trató con exceso de cloruro de tionilo obteniendo el cloruro de 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1H-benzimidazol-6-carbonilo.

Posteriormente, en el mismo matraz de reacción se llevó a cabo la adición de carbazato de *tert*-butilo, permitiendo obtener la carboxamida final **PYP4**. A continuación se llevó a cabo la hidrólisis del grupo *tert*-butiloxicarbonilo (*tert*-Boc) de **PYP4** utilizando HCl en dioxano obteniendo la hidracida correspondiente; ésta se hizo reaccionar con el 5-nitrofurano-2-carbaldehído para obtener la carboxamida final **PYP7**.



Esquema 3. Secuencia de síntesis para la obtención de las carboxamidas **PYP4** y **PYP7**. Reactivos y condiciones: (a) 6 eq. SOCl_2 , calor; (b) carbazato de *tert*-butilo, CH_3CN , Et_3N ; (c) HCl/Dioxano, THF; (d) 5-nitrofurano-2-carbaldehído, EtOH

6.2. Parte Biológica

6.2.1. Prueba de determinación de la actividad enzimática de las enzimas TIM de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*

En este ensayo se evaluó la actividad de las carboxamidas finales sobre la TIM de *T. cruzi* y *T. brucei*, mediante el método de cuantificación de NADH, previamente estandarizado. Las proteínas recombinantes TcTIM y TbTIM a una concentración de 5 µg/mL se incubaron a 36°C en un buffer que contenía 100 mM de trietanolamina, 10 mM de EDTA, pH 7.4 y el compuesto correspondiente a ser probado disuelto en 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Después de 2 horas, 1 µL se trasvasó a 1 mL de mezcla de reacción, que contenía NADH, gliceraldehído 3-fosfato y α-glicerol fosfato deshidrogenasa, para el ensayo de actividad. La inhibición de TcTIM y TbTIM se cuantificó indirectamente por el consumo en la cantidad de NADH por la reducción de DHAP por la α-glicerolfosfato deshidrogenasa.

6.2.2. Prueba de susceptibilidad *in vitro* para protozoarios

Para la evaluación de la actividad antiprotozoaria se empleó el método de subcultivos, previamente estandarizado. De forma breve el procedimiento es el siguiente. Se incubaron 4×10^6 trofozoítos de *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis* por 48 horas a 37 °C, en tubos con concentraciones crecientes de la carboxamida correspondiente (0.005, 0.010, 0.050, 0.100, 0.500 µg/mL), utilizando como compuestos de referencia albendazol y metronidazol y nitazoxanida. Para el control negativo se emplearon trofozoítos en medio libre de compuesto de prueba agregando DMSO en la concentración usada como disolvente.

Se inocularon 50 µL de los trofozoítos tratados en medio fresco sin compuestos y se incubaron por 48 horas más. Posteriormente, se determinó el número final de trofozoitos con un hemocitómetro. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento en comparación con el control y posteriormente mediante análisis Probit se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀), que corresponde a la concentración que inhibió el crecimiento de 50% de los trofozoítos. Los experimentos se efectuaron dos veces por triplicado.

6.3 Parte Computacional

6.3.1. Obtención de las estructuras cristalográficas y minimización

Las enzimas de estudio se localizaron en la base de datos del Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>). Seleccionando las enzimas con mayor resolución, las cuales fueron identificadas como:

- Triosafosfato Isomerasa de *H. sapiens* (HsTIM) ID PDB 2JK2
- Triosafostafo Isomerasa de *T. brucei* (TbTIM) ID PDB 1IIH
- Triosafosfato Isomerasa de *T. cruzi* (TcTIM) ID PDB 1TCD

Las proteínas se descargaron de la base de datos del PDB utilizando el programa Maestro 9.3⁵⁷ de *Schrödinger*; a las proteínas se les retiraron las moléculas pertenecientes a la solución criogénica tales como agua, iones o ligandos. Posteriormente las estructuras se corrigieron para verificar si su secuencia de aminoácidos estaba completa y eliminar choques estéricos presentes en la estructura cristalográfica utilizando las herramientas del servidor WHAT-IF⁵⁸.

La geometría de las proteínas se optimizó con el programa *GROMACS 4.5.3*,⁵⁹ utilizando el campo de fuerza *GROMOS96 43a1*.

6.3.2. Preparación de los ligandos

Los ligandos se construyeron utilizando el programa *Spartan10*⁶⁰, donde se optimizó su geometría mediante el método semiempírico PM6. Posteriormente, los átomos de hidrógeno no polares se fusionaron a sus carbonos correspondientes y se detectaron los centros de torsión y los enlaces rotables, usando el programa *AutoDock 4.2*⁶¹ y su interfaz gráfica *AutoDock Tools 1.5.4* (ADT).

6.3.3. Preparación de la proteína

Después de la minimización energética de las proteínas, éstas se prepararon utilizando *AutoDock Tools 1.5.4*⁶² donde sólo se agregaron los hidrógenos polares capaces de formar puentes de hidrógeno y se corrigieron las cargas.

6.3.4. Acoplamiento molecular

Con ADT, usando el módulo *Autogrid* de *AutoDock Tools 1.5.4*.⁶² se determinó una caja de búsqueda o *Grid* con una dimensión de 100x100x100 Å, la cual se centró en la interfaz de las proteínas. Posteriormente, se realizó el cálculo de acoplamiento molecular de todos los ligandos en cada una de las proteínas utilizando *AutoDock 4.2*⁶¹, empleando un algoritmo genético tipo Lamarckiano con un tamaño de población de 150, 5×10^7 evaluaciones y 20 corridas. Se seleccionaron las conformaciones energéticamente más favorables del conjunto de conformaciones más abundante.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**7.1. Resultados parte química**

En la **Tabla 4** se muestran las características fisicoquímicas más importantes de los intermediarios y productos finales sintetizados. En la **Tabla 5** se presentan las constantes espectroscópicas de IR, RMN ^1H , RMN ^{13}C y espectrometría de masas, así como las asignaciones para cada compuesto.

Tabla 4. Constantes físicas de los compuestos sintetizados

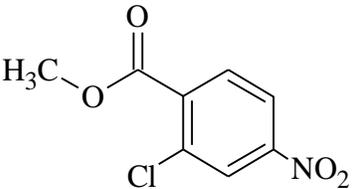
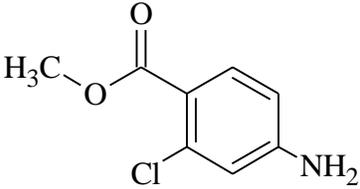
Compuesto	Rendimiento (%)	Disolvente utilizado para recristalización	Punto de fusión (°C)	R_f (Sistema)
2	95.50	Etanol	76.0-76.5	0.63 (I)
3	95.02	Agua	108.5-109.5	0.50 (I)
4	92.34	Tolueno	114.8-115.4	0.38 (I)
5	92.77	Acetato de etilo	138.9-139.7	0.72 (I)
6	88.54	Etanol	218.2-221-3	0.64 (I)
7	92.47	nd	nd	0.23 (I)
8	78.20	Etanol/DMF	250.1-251.0	0.33 (I)
10	23.22	Etanol	113.3-114.3	0.39 (III)
11	59.28	Etanol	252.0-253.0	0.20 (I)
PYP1	75.40	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt	222.2-223-6	0.56 (IV)

Tabla 4. Constantes físicas de los compuestos sintetizados (continuación)

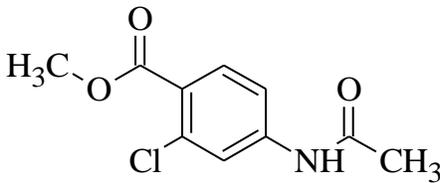
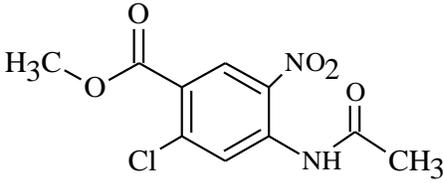
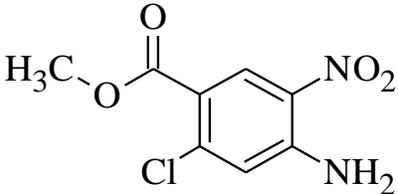
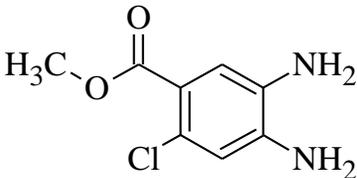
PYP2	34.14	Lavados Metanol/Agua	169.3-169.8	0.62 (IV)
PYP3	54.00	Hexano/AcOEt	217.8-218.3	0.73 (IV)
PYP4	95.00	Lavados de Etanol	211.4-211.8	0.60 (I)
PYP5	24.30	Lavados Cloroformo	271.8-272.5	0.69 (IV)
PYP7	98.00	Lavados de Etanol	245.0-249.0	0.72 (IV)

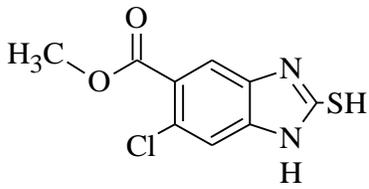
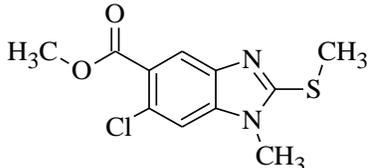
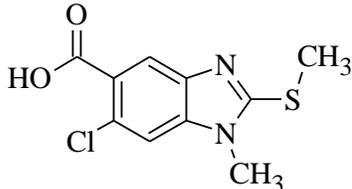
nd: no determinado

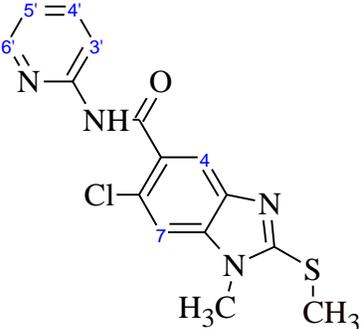
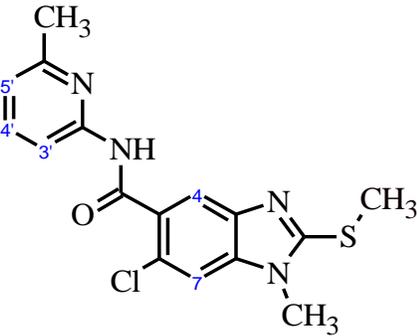
Tabla 5. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos sintetizados

COMPUESTO	SEÑALES
<p>2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2)</p> 	<p>Espectro 1, IR: Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3099 (C-H Aromático); 2965 (-CH₃); 1719 (C=O de éster); 1527 y 1356 (Ar-NO₂); 1297 (C-O-C de éster).</p> <p>Espectro 2, RMN ¹H: (TMS, CDCl₃) ppm: 3.995 (s, 3H, -CH₃ de éster); 7.978 (dd, $J_1=8.7$, $J_2=0.3$ Hz, 1H, H-6); 8.167 (dd, $J_1=8.7$ Hz, $J_2=2.1$ Hz, 1H, H-5); 8.317 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, H-3).</p> <p>Espectro 3, EM: IE/ID m/z: 215 (M⁺, 32%); 217 (M+2, 10%); 184 (M-31, 100%).</p>
<p>4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3)</p> 	<p>Espectro 4, IR: Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3426 y 3336 (Ar-NH₂); 3221 (C-H Aromático); 2951(-CH₃); 1702 (C=O de éster); 1264 (C-O-C, de éster).</p> <p>Espectro 5, RMN ¹H: (TMS, CDCl₃) ppm: 3.714 (s, 3H, -CH₃ de éster); 6.171 (sa, 2H, int. con D₂O, NH₂); 6.496 (dd, $J_1=8.7$ Hz, $J_2=2.4$ Hz, 1H, H-5); 6.617 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, H-3); 7.626 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H-6).</p> <p>Espectro 6, EM: IE/ID m/z: 185 (M⁺, 55%); (M+2, 18%); 154 (M-31, 100%).</p>

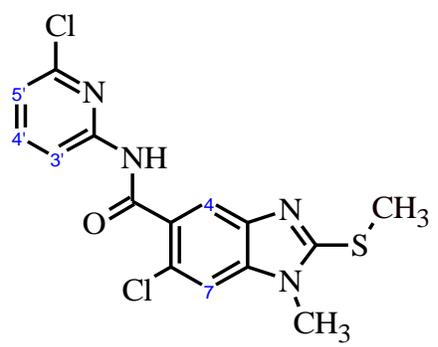
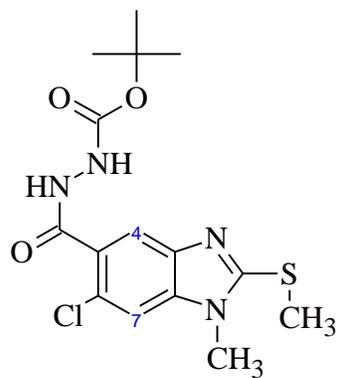
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

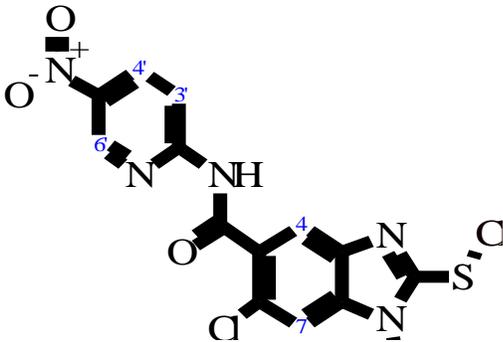
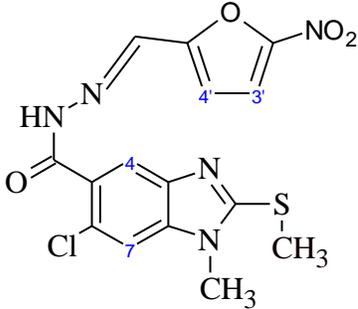
<p>4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4)</p> 	<p>Espectro 7, IR: Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3308 (NH); 3106 (C-H Aromático); 2947(-CH₃); 1724 (C=O de éster); 1678 (C=O de amida); 1592 (N-C=O); 1251(C-O-C, de éster).</p> <p>Espectro 8, RMN ¹H: (TMS, CDCl₃) ppm: 2.208 (s, 3H, CH₃CO); 3.910 (s, 3H, -OCH₃ de éster); 7.499 (dd, $J_1=8.7$ Hz, $J_2=2.1$ Hz, 1H, H-5); 7.713 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, H-3); 10.380 (sa, 1H, int. con D₂O, -NH-); 7.841 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H-6).</p> <p>Espectro 9, EM: IE/ID m/z: 227 (M+, 39%); 229 (M+2, 13%); 185 (M-42, 68%); 154 (M-73, 100%).</p>
<p>4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5)</p> 	<p>Espectro 10, IR: Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3343 (R-NH-C=O); 3123 (C-H Aromático); 2952(-CH₃); 1732 (C=O de éster); 1713 (C=O de amida); 1529 y 1335 (Ar-NO₂); 1230 (C-O-C, de éster).</p> <p>Espectro 11, RMN ¹H: (TMS, CDCl₃) ppm: 2.337 (s, 3H, CH₃CO); 3.963 (s, 3H, -OCH₃ de éster); 8.824 (s, 1H, H-3); 9.054 (s, 1H, H-6); 10.523 (s, 1H, int. con D₂O, -NH-).</p> <p>Espectro 12, EM: IE/ID m/z: 272 (M+, 17%); 274 (M+2, 26%); 230 (M-42, 100%), 226 (M-46, 17%).</p>
<p>4-Amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6)</p> 	<p>Espectro 13, IR: Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3453 y 3348 (Ar-NH₂); 3245 (C-H Aromático); 2950 (-CH₃); 1707 (C=O de éster); 1627 (N-H); 1534 (Ar-NO₂), 1369 (C-O-C, de éster).</p> <p>Espectro 14, RMN ¹H: (TMS, acetona-<i>d</i>₆) ppm: 3.856 (s, 3H, -OCH₃ de éster); 7.218 (s, 1H, H-3); 7.562 (sa, 2H, int. con D₂O, -NH₂); 8.705 (s, 1H, H-6).</p> <p>Espectro 15, EM: IE/ID m/z: 230 (M+, 77%); 232 (M⁺², 24%); 199 (M-31, 100%).</p>
<p>4,5-Diamino-2-clorobenzoato de metilo (7)</p> 	<p>Espectro 16, IR: Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3403 y 3324 (Ar-NH₂), 3081 (C-H Aromático), 2952 (-CH₃), 1716 (C=O de éster); 1641 (N-H); 1362 (C-O-C, de éster).</p> <p>Espectro 17, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆) ppm: 3.704 (s, 3H, -OCH₃ de éster); 4.782 (sa, 2H, int. con D₂O, -NH₂); 5.487 (sa, 2H, int. con D₂O, -NH₂); 6.537 (s, 1H, H-3); 7.104 (s, 1H, H-6).</p> <p>Espectro 18, EM: IE/CG m/z: 200 (M+, 100%); 202 (M+2, 33%); 169 (M-31, 90%).</p>

<p>6-Cloro-1-mercapto-1<i>H</i>-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (8)</p> 	<p>Espectro 19, IR: Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3241 (Ar-NH-R); 3042 (C-H Aromático); 2912 (-CH₃); 1704 (C=O de éster); 1632 (C=N); 1253 (C=S); 1182 (C-O-CH₃, de éster).</p> <p>Espectro 20, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆) ppm: 3.827 (s, 3H, -OCH₃ de éster); 7.216 (s, 1H, H-7); 7.522 (s, 1H, H-4); 12.898 (s, 2H, int. con D₂O, -N-H de la forma de tiona).</p> <p>Espectro 21, EM: IE/CG <i>m/z</i>: 242 (M+, 100%); 244 (M+2, 37%); 211 (M-31, 72%).</p>
<p>6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-1<i>H</i>-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (9)</p> 	<p>Espectro 22, IR: Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3001 (C-H Aromático); 2928 (-CH₃); 1724 (C=O de éster); 1620 (C=N); 1237 (C-O-C, de éster).</p> <p>Espectro 23, RMN ¹H: (TMS, CDCl₃) ppm: 2.748 (s, 3H, -SCH₃); 3.690 (s, 3H, -NCH₃); 3.867 (s, 3H, -OCH₃ de éster); 7.757 (s, 1H, H-7); 7.963 (s, 1H, H-4).</p> <p>Espectro 24, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 270 (M+, 100%); 272 (M+2, 38%); 239 (M-31, 47%).</p>
<p>Ácido 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1<i>H</i>-bencimidazol-5-carboxílico (11)</p> 	<p>Espectro 25, IR: Pastilla (KBr) cm^{-1}: 3450 (HO-); >3000 (C-H Aromático); 2933 y 256 (-CH₃); 1699 (C=O); 1613 (C=N); 1255 (C-S-CH₃).</p> <p>Espectro 26, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆) ppm: 2.719 (s, 3H, -SCH₃); 3.662 (s, 3H, -NCH₃); 7.703 (s, 1H, H-7); 7.929 (s, 1H, H-4); 13.191 (sa, 1H, int. con D₂O, -O-H de ácido).</p> <p>Espectro 27, EM: IE/ID <i>m/z</i>: 256 (M+, 100%); 258 (M+2, 36%); 223 (M-33, 66%).</p>

<p>6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-<i>N</i>-(piridina-2-il)-1<i>H</i>-bencimidazol-5-carboxamida (PYP1)</p> 	<p>Espectro 28, IR: FTIR reflectancia cm^{-1}: 3382 (-NH- de amida); >3000 (C-H Aromático); 2942 (-CH₃); 1691 (C=O de amida); 1568 (HN- CO-); 1305 (Ar-N-R); 1258 (C-S-CH₃).</p> <p>Espectro 29, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 400 MHz) ppm: 2.714 (s, 3H, -SCH₃); 3.342 (s, 3H, -NCH₃); 6.987-7.017 (m, 1H, H-5'); 7.450 (s, 1H, H-7); 7.685 (t, $J_1 = 8.0$ Hz $J_2 = 8.8$ Hz, 1H, H-4'); 7.832 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-3'); 7.435 (s, 1H, H-4); 8.489 (m, 1H, H-6'); 13.121 (sa, 1H, -NH).</p> <p>Espectro 30, RMN ¹³C: (DMSO-<i>d</i>₆, 101 MHz) ppm: 14.97; 30.30; 111.60; 119.92; 126.04; 129.72; 138.96; 139.77; 142.55; 154.20; 157.02; 171.22.</p> <p>Espectro 31, EM: ID/IE <i>m/z</i>: 239 (M-93, 100%), 297 (M-35, 39%).</p> <p>HRSM ESI: Calculada para [C₁₅H₁₃ClN₄OSNa]⁺: 355.0356; determinada: 355.0396</p>
<p>6-Cloro-1-metil-<i>N</i>-(6-metilpiridin-2-il)-2-(metiltio)-1<i>H</i>-bencimidazol-5-carboxamida (PYP2)</p> 	<p>Espectro 32, IR: FTIR reflectancia cm^{-1}: 3382 (NH- de amida); 3159 (C-H Aromático); 2933 (-CH₃); 1653 (C=O de amida); 1552 (HN- CO); 1304 (Ar-N-R); 1274 (C-S-CH₃).</p> <p>Espectro 33, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 300 MHz) ppm: 2.401 (s, 3H, CH₃ en 6'); 2.729 (s, 3H, -SCH₃); 3.686 (s, 3H, -NCH₃); 7.011 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-5'); 7.657 (s, 1H, H-7); 7.709 (s, 1H, H-4); 7.712 (t, $J_1 = 8.1$ Hz, $J_2 = 7.8$ Hz, 1H, H-4'); 8.032 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-3'); 10.837 (sa, 1H, NH de amida).</p> <p>Espectro 34, RMN ¹³C: (DMSO-<i>d</i>₆, 75 MHz) ppm: 14.21; 23.67; 30.17; 110.47; 111.08; 117.54; 119.08; 123.31; 129.90; 138.08; 138.52; 140.99; 151.42; 155.39; 156.65; 166.30.</p> <p>Espectro 35, EM: ID/IE <i>m/z</i>: 311 (M-35, 100%), 239 (M-107, 85%), 121 (M-211, 15%).</p> <p>HRSM ESI: Calculada para [C₁₆H₁₅ClN₄OS+1]: 347.0733; determinada: 347.0733</p>

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<p>6-Cloro-<i>N</i>-(6-cloropridin-2-il)-1-metil-2-(metiltio)-1<i>H</i>-bencimidazol-5-carboxamida (PYP3)</p> 	<p>Espectro 36, IR: FTIR reflectancia cm^{-1}: 3389 (NH- de amida); 3126 (C-H Aromático); 2924 (-CH₃); 1669 (C=O de amida); 1568 (HN- CO); 1301 (Ar-N-R); 1256 (C-S-CH₃).</p> <p>Espectro 37, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 300 MHz) ppm: 2.731 (s, 1H, -SCH₃); 3.692 (s, 1H, -NCH₃); 7.258 (d, <i>J</i>=7.7 Hz, 1H, H-5'); 7.701 (s, 1H, H-7); 7.733 (s, 1H, H-4); 7.903 (t, <i>J</i>₁=7.8 <i>J</i>₂=8.0 Hz, 1H, H-4'); 8.199 (d, <i>J</i>=8.1 Hz, 1H, H-3'); 11.245 (s, 1H, int. con D₂O, N-H de amida).</p> <p>Espectro 38, RMN ¹³C: (DMSO-<i>d</i>₆, 75 MHz) ppm: 14.21, 30.19, 110.58, 112.70, 117.71, 119.62, 123.31, 129.37, 138.26, 140.94, 141.81, 148.11, 152.08, 155.58, 166.49.</p> <p>Espectro 39, EM: ID/IE <i>m/z</i>: 366 (M⁺ 2%), 331 (M-35, 47%), 239 (M-127, 100%).</p> <p>HRSM ESI: Calculada para [C₁₅H₁₂Cl₂N₄OS+1]: 367.0187; determinada: 367.0202</p>
<p>2-[[6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-1<i>H</i>-bencimidazol-5-il]carbonil]hidrazinocarboxilato de <i>tert</i>-butilo (PYP4)</p> 	<p>Espectro 40, IR: FTIR reflectancia cm^{-1}: 3386 (NH- de amida); 3120 (C-H Aromático); 2912 (-CH₃); 1708 (C=O de éster); 1692 (C=O de amida); 1497 (HN- CO-); 1308 (Ar-N-R); 1276 (C-S-CH₃); 1164 (R-CO-O-R).</p> <p>Espectro 41, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 300 MHz) ppm: 1.428 (s, 9H, <i>t</i>-butilo); 2.725 (s, 1H, -SCH₃); 3.676 (s, 1H, -NCH₃); 7.552 (s, 1H, H-7); 7.724 (s, 1H, H-4); 9.013 (sa, 1H, int. con D₂O, N-H de amida); 9.973 (sa, 1H, int. con D₂O, N-H de amida).</p> <p>Espectro 42, RMN ¹³C: (DMSO-<i>d</i>₆, 75 MHz) ppm: 14.17, 28.16, 30.18, 79.24, 110.98, 123.73, 127.55, 138.30, 140.90, 143.16, 155.66, 166.53 y 168.52.</p> <p>Espectro 43, EM: ID/IE <i>m/z</i>: 239 (M-131, 100%), 211 (M-159, 14%).</p> <p>HRSM ESI: Calculada para [C₁₅H₁₉ClN₄O₃S+1]: 371.0945; determinada: 371.0963</p>

<p>6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-<i>N</i>-(5-nitropiridin-2-il)-1<i>H</i>-bencimidazol-5-carboxamida (PYP5)</p> 	<p>Espectro 44, IR: FTIR reflectancia cm^{-1}: 3229 (NH- de amida); 3133 (C-H Aromático); 2933 (-CH₃); 1680 (C=O de amida); 1513 y 1343 (Ar-NO₂); 1274 (C-S-CH₃).</p> <p>Espectro 45, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 400 MHz) ppm: 2.731 (s, 1H, -SCH₃); 3.698 (s, 1H, -NCH₃); 7.761 (s, 1H, H-7); 7.768 (s, 1H, H-4); 8.429 (d, <i>J</i>= 9.2 Hz, 1H, H-3'); 8.654 (dd, <i>J</i>₁= 9.2 Hz, <i>J</i>₂= 2.7Hz, H-4'); 9.190 (d, <i>J</i>=2.7 Hz, 1H, H-6'); 11.702 (s, 1H, int. con D₂O, N-H de amida).</p> <p>Espectro 46, RMN ¹³C:(DMSO-<i>d</i>₆, 101 MHz) ppm: 14.18, 30.18, 110.69, 113.16, 117.89, 123.31, 128.82, 134.33, 138.47, 140.14, 140.97, 144.78, 155.78, 156.15, 166.91.</p> <p>Espectro 47, EM: ID/IE <i>m/z</i>: 342 (M-35, 100%), 239 (M-138, 55%), 211 (M-166, 13%).</p> <p>HRSM ESI: Calculada para: [C₁₅H₁₂ClN₅O₃S+1] 378.0428; determinada: 378.0415</p>
<p>6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-<i>N</i>-[(5-nitrofurano-2-il)metilen]-1<i>H</i>-bencimidazol-5-carboxidracida (PYP7)</p> 	<p>Espectro 48, IR: FTIR reflectancia cm^{-1}: >3000 (NH- de amida); 3064 (C-H Aromático); 2934 (-CH₃); 1653 (C=O de amida); 1555 (HN- CO-); 1349 (Ar-NO₂); 1313 (Ar-N-R); 1276 (C-S-CH₃).</p> <p>Espectro 49, RMN ¹H: (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, 400 MHz) ppm Isómero <i>E</i>: 2.734 (s, 1H, -SCH₃); 3.703 (s, 1H, -NCH₃); 7.235 (d, <i>J</i>= 3.6 Hz, 1H, H-4'); 7.749 (s, 1H, H-7); 7.808 (s, 1H, H-4); 7.798 (s, 1H, N=CH); 8.235 (s, 1H, H-3'); 12.253 (s, 1H, int. con D₂O, NH de amida). Isómero <i>Z</i>: 2.734 (s, 1H, -SCH₃); 3.703 (s, 1H, -NCH₃); 6.967 (d, <i>J</i>= 3.2 Hz, 1H, H-4'); 7.749 (s, 1H, H-7); 7.808 (s, 1H, H-4); 7.570 (s, 1H, N=CH); 7.663 (d, <i>J</i>= 3.6 Hz, 1H, H'3); 12.253 (s, 1H, int. con D₂O, NH de amida).</p> <p>Espectro 50, RMN ¹³C: (DMSO-<i>d</i>₆, 101 MHz) ppm: 14.20, 30.72, 110.97, 114.45, 115.48, 117.84, 123.64, 127.51, 135.35, 138.52, 141.07, 151.65, 151.97, 155.98, 163.30.</p> <p>Espectro 51, EM: ID/IE <i>m/z</i>: 393 (M⁺, 3%), 239 (M-155, 100%), 241 (M-153, 35%), 211 (M-183, 13%)</p> <p>HRSM ESI: Calculada para [C₁₅H₁₂ClN₅O₄S+1]: 394.0377; determinada: 394.0366</p>

7.1.1. Obtención del ácido 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (11)

Para obtención del compuesto **11**, se inició con la esterificación del ácido **1**, mediante una reacción de sustitución nucleofílica utilizando sulfato de dimetilo como agente alquilante y el carboxilato como nucleófilo. La reacción se llevó a cabo con conversión total de la materia prima **1** con rendimientos altos. La identificación estructural del éster **2** se realizó por espectroscopia, y en espectro de RMN ^1H se identificó el metilo del éster por la presencia de un singulete que integró para 3H a 3.995 ppm. Por medio de espectrometría de masas se comprobó la masa molecular del compuesto con m/z de 215 (32%), así como el fragmento de m/z 184 el cual correspondió a la pérdida del metoxilo del grupo éster que originó el pico base del espectro. En el espectro de IR se observó la pérdida de la banda ancha de $-\text{OH}$ del grupo carboxilo, y en donde se identificó la banda del estiramiento del enlace de $-\text{OCH}_3$ de éster a 1297cm^{-1} .

La reducción catalítica del grupo nitro del compuesto **2** generó el 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (**3**). Esta reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y se decidió utilizar Ni/Raney como catalizador, ya que por experiencias previas en nuestro laboratorio, el uso de Pd/C como catalizador promueve la eliminación de halógenos en la molécula, como el del cloro de la posición 2. El espectro de RMN ^1H del compuesto **3** mostró una señal amplia que integró para 2H correspondiente al grupo $-\text{NH}_2$ en 6.171 ppm; además se comprobó con intercambio los hidrógenos ácidos por deuterio eliminando las señales antes vistas. Con espectrometría de masas se comprobó la masa molecular del compuesto con m/z de 185 (55%), también se observó el fragmento de m/z de 154 correspondiente a la pérdida del $-\text{OCH}_3$. En el espectro de IR se observaron dos picos en 3426 y 3336cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de los enlaces de hidrógeno del $-\text{NH}_2$ presente en la molécula.

El siguiente paso fue la acetilación de la amina **3** para dar el 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (**4**), con la finalidad de proteger el grupo amino antes de nitrar. En el espectro de RMN ^1H se observó un singulete en 2.208 ppm que integró para 3H correspondientes al metilo del acetilo y una señal característica del N-H de la acetanilida en 10.380 ppm que integró para un hidrógeno, esta señal desapareció cuando se hizo intercambio con D_2O . El espectro de masas se confirmó la masa molecular del compuesto de m/z de 227 (39%). En el espectro de IR se observó la banda característica del carbonilo de amida en 1678cm^{-1} .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Posteriormente, el compuesto **4** se nitró con mezcla sulfonítrica para obtener el 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**5**). La formación del ion nitronio se realizó *in situ* por la adición del ácido nítrico a la solución fría de **4** en H₂SO₄, la reacción se llevó a cabo entre 0 y 5 °C de temperatura con la finalidad de disminuir la formación del isómero nitrado en la posición 3, el cual se eliminó con cristalización fraccionada de AcOEt. El espectro de RMN ¹H mostró sólo dos señales simples pertenecientes a los hidrógenos aromáticos H-3 y H-6 a 8.824 y 9.054 ppm respectivamente. Por otro lado, la espectrometría de masas confirmó la masa molecular del compuesto de *m/z* de 272 (17%). En el espectro de IR se observaron las bandas características a los estiramientos asimétricos y simétricos del grupo nitro en 1529 y 1335 cm⁻¹ respectivamente.

La nitroacetanilida **5** se sometió a hidrólisis básica en sosa metanólica a temperatura ambiente dando el 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**6**) con un buen rendimiento. La reacción procedió rápidamente debido a la vecindad del grupo acetamida con el nitro. En estas condiciones no se hidrolizó el éster. La transformación se comprobó por sus datos espectroscópicos, así en el espectro de RMN ¹H se observó una señal amplia que integró para dos hidrógenos en 7.562 ppm correspondiente al -NH₂ que desapareció cuando se realizó el intercambio con D₂O. La espectrometría de masas mostró el pico correspondiente al ion de *m/z* de 230 (77%) concordante con la masa molecular calculada para el compuesto **6**. Por otro lado en el espectro de IR se observaron dos bandas en 3453 y 3348 cm⁻¹ correspondientes a los estiramiento asimétricos y simétricos de Ar-NH₂; además, no se observó ninguna banda característica a las vibraciones de C=O de amida alrededor de 1660 cm⁻¹.

El grupo nitro presente en el compuesto **6** se redujo mediante una hidrogenación catalítica a temperatura ambiente utilizando Ni/Raney como catalizador; de este modo se obtuvo el 4,5-diamino-2-clorobenzoato de metilo (**7**) con un rendimiento del 92.5%. La bencendiamina se utilizó sin algún tratamiento en la reacción de ciclocondensación siguiente, debido a su inestabilidad ya que se oxida rápidamente; no obstante, una muestra pura se obtuvo después de eliminar el disolvente y guardarla bajo atmósfera de N₂ para determinar sus constantes espectroscópicas. El espectro de RMN ¹H mostró dos señales amplias en 4.782 y 5.487 ppm correspondientes a las dos aminas, estas señales desaparecieron cuando se realizó el intercambio con D₂O. Por otro lado la espectrometría de masas confirmó masa molecular del

compuesto con m/z de 200 (100%). En el espectro de IR se observaron dos bandas pequeñas en 3403 y 3324 cm^{-1} correspondiente a las dos aminas primarias; además desapareció la banda característica al estiramiento Ar-NO₂ en 1534 cm^{-1} .

Posteriormente la *o*-fenilendiamina **7** se sometió a la reacción de ciclocondensación con disulfuro de carbono en medio básico obteniendo el 6-cloro-2-(metilito)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**8**). Primeramente se formó el xantato de etilo *in situ* adicionando disulfuro de carbono a temperatura ambiente a la solución alcohólica básica de la diamina. Posterior a la adición de los reactivos la reacción se mantuvo una temperatura de reacción por debajo de 65 °C y pH de 9 con la finalidad de evitar la hidrólisis del éster. Mediante espectroscopia de RMN ¹H se identificó una señal en 12.898 ppm que integró para dos hidrógenos y desapareció al realizar el intercambio con D₂O con lo que se comprobó los hidrógenos unidos a nitrógenos en posición 1 y 3 del anillo de bencimidazol cuando se encuentra en forma de tiona. Por otra parte, el espectro de masas comprobó la masa molecular del compuesto de m/z de 242 como pico base. Además el espectro de masas mostró el ion molecular M+2 de m/z : 244 (37%), indicativo de los efectos sumados de los isotopos cloro y azufre para este compuesto, el fragmento de m/z de 211 (72%) correspondió a la pérdida del OCH₃. En el espectro de IR se observaron bandas a 3241 cm^{-1} correspondiente al estiramiento N-H del anillo de bencimidazol, así como la banda a 1253 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C=S cuando está en forma de tiona.

Posteriormente se llevó a cabo la metilación exhaustiva del 2-mercaptobencimidazol **8** utilizando 2.1 equivalentes de yoduro de metilo en medio básico. El exceso de yoduro de metilo permitió la *S*-metilación y la *N*-metilación simultáneamente obteniendo así los dos isómeros: 6-cloro-1-metil-2-(metilito)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**9**) y 5-cloro-1-metil-2-(metilito)-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (**10**) en proporción 40:60 aproximadamente. La metilación procedió de manera rápida y a temperatura ambiente. Para poder separar el isómero de interés, compuesto **9**, se realizó una separación por cromatografía en columna flash, utilizando CHCl₃ como fase móvil y gel de sílice 60 (Merck), con un tamaño de partícula de 0.04 – 0.063 nm y malla 230 – 400 mesh como fase estacionaria. El espectro de RMN ¹H mostró una señal en 2.748 ppm que integró para tres hidrógenos que correspondieron al metilo unido al azufre, además se observó otra señal simple en 3.690 ppm correspondiente a los hidrógenos del -CH₃ unido al nitrógeno del anillo

de bencimidazol. La identidad del isómero **9** se comprobó al comparar su p.f y R_f con una muestra pura del previamente analizada mediante el experimento NOE diferencial de RMN¹H (análisis unidimensional) cuyos resultados se encuentran reportados en la tesis de licenciatura de Carlos Méndez.⁵⁶ La espectrometría de masas comprobó la masa molecular del compuesto de *m/z* 270 (100%), también se observó la pérdida de OCH₃ en el *m/z* 239 (M⁺-31, 47%). En el espectro de IR se observó una banda en 1620 cm⁻¹ correspondiente a las vibraciones C=N y se observó también la banda del carbonilo del éster en 1724 cm⁻¹. Además se observó una banda en 2928 cm⁻¹ la cual pertenece a la vibración por el estiramiento asimétrico del -CH₃.

7.1.2. Obtención de las carboxamidas finales PYP1, PYP2, PYP3, y PYP5.

La preparación de las carboxamidas finales **PYP1**, **PYP2**, **PYP3**, y **PYP5** se llevó a cabo siguiendo la ruta sintética mostrada en el **Esquema 2**. Primeramente se activó el ácido carboxílico **11**, formando el cloruro del ácido correspondiente, para ello se utilizó un exceso de cloruro de tionilo el cual se utilizó también como disolvente. Una vez formado el cloruro de ácido este se hizo reaccionar por separado con cada una de las cuatro diferentes aminas (2-aminopiridina, 2-amino-6-metilpiridina, 2-amino-6-cloropiridina y 2-amino-5-nitropiridina), mediante una reacción de sustitución nucleofílica en carbono *sp*². Para activar al ácido carboxílico, también se utilizaron otros agentes activadores como 1,1-carbonildiimidazol (CDI), pero el uso de cloruro de tionilo fue la opción más viable.

Las condiciones para preparar las carboxamidas **PYP1**, **PYP2**, **PYP3** y **PYP5** fueron iguales, el cloruro de ácido se disolvió en acetonitrilo y en seguida se trató con la amina correspondiente, dejándose reaccionar por 3 horas a temperatura ambiente, excepto para **PYP3** cuya reacción terminó en 5 horas. Los rendimientos fueron de malos a moderados de 24% a 67% siendo la **PYP1** la que se obtuvo con mayor rendimiento y la **PYP5** la de más bajo rendimiento, aunque esta última fue la reacción más rápida ya que terminó en 2 horas. La formación de un sólido en el medio de reacción impidió que el cloruro del ácido reaccionara por completo, lo que justifica el bajo rendimiento de esta reacción.

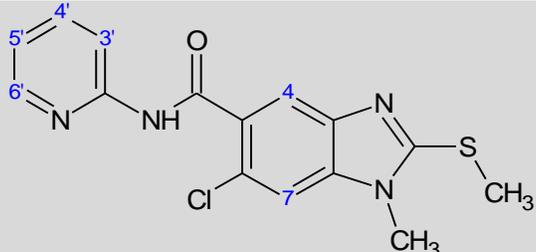
Cada uno de los compuestos se caracterizó mediante espectroscopia de RMN ¹H. Todos presentaron las señales correspondientes a los H-4 y H-7 del núcleo del bencimidazol

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

aparecieron en el rango de 7.400-7.800 ppm. Adicionalmente, los singletes correspondientes a $-SCH_3$ $-NCH_3$ aparecieron en los rangos 2.714-2.731 ppm y 3.342-3.698 ppm. En el caso particular de **PYP1**, la señal correspondiente a Pyr- CH_3 aparece en 2.461 ppm. Estos datos pueden observarse a detalle en la **Tabla 5**.

En la **Tabla 6** se muestran los valores de las diferentes señales correspondientes a los hidrógenos de la parte piridínica de las moléculas. En el caso de **PYP1**, para los H-5' y H-6' no se observó la multiplicidad esperada sino que se presentaron como multipletes, este fenómeno se debe en gran medida a que se utilizó piridina- d_5 como disolvente.

Tabla 6. Desplazamientos y multiplicidad observada para los hidrógenos 3'-6' de las carboxamidas sintetizadas

				
Compuesto	3'	4'	5'	6'
PYP1	7.832 ppm doblete $J=8.4$ Hz,	7.685 ppm triplete, $J_1=8.0$ Hz $J_2=8.8$ Hz	6.987-7.017 ppm multiplete	8.489 ppm multiplete
PYP2	8.032 ppm doblete $J=8.1$ Hz	7.709 ppm triplete $J_1=8.1$ Hz $J_2=7.8$ Hz	7.011 ppm doblete $J=7.5$ Hz	-----
PYP3	8.199 ppm doblete $J=8.1$ Hz	7.903 ppm triplete $J_1=7.8$, $J_2=8.0$ Hz	7.258 ppm doblete $J=7.7$ Hz	-----
PYP5	8.429 ppm doblete $J=9.2$ Hz	8.654 ppm doble de dobles $J_1=9.2$ Hz, $J_2=2.7$ Hz	-----	9.190 ppm doblete $J=2.7$ Hz,

Respecto a la RMN ^{13}C , se observaron las señales esperadas para los carbonos presentes en las moléculas; destacan tres señales por arriba de 140 ppm correspondientes a los

carbonos C-2, C=O y C-2' como se muestran en la **Figura 8**. En el caso de **PYP1** sólo se lograron visualizar 9 carbonos de los 15 presentes en la molécula, esta falta de señales puede ser explicada por la baja solubilidad del compuesto. Adicionalmente la lenta relajación que presentan ciertos núcleos de ^{13}C , en especial los de tipo cuaternario, es mayor el tiempo que transcurre entre pulso y pulso, lo que hace que la intensidad de estos carbonos sea menor que la del resto.

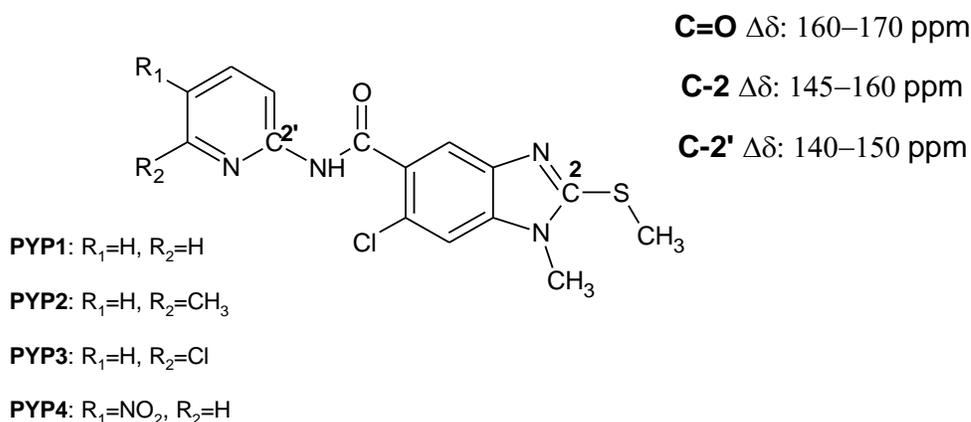


Figura 8. Principales señales en RMN ^{13}C , correspondientes a C-2, C=O y C-2'.

Los compuestos **PYP1**, **PYP2**, **PYP3** y **PYP5** fueron analizados mediante espectrometría de masas. Es importante mencionar que el ión molecular en algunos casos no se observó o tuvo una abundancia relativa inferior al 5%, debido a que los compuestos son sensibles a las condiciones de la técnica de análisis; sin embargo, sí se observaron las principales fragmentaciones que sufren las moléculas. En la **Tabla 7** se muestran los principales fragmentos en los compuestos finales. Además mediante la técnica espectrometría de masas de alta resolución por el método de ionización por electrospray se determinó la masa del ión molecular, M+1 o M+23, de los compuestos.

Tabla 7. Principales fragmentos y su relación m/z de los compuestos **PYP1**, **PYP2**, **PYP3** y **PYP5**

Compuesto	R ₁	R ₂	Fragmento A m/z (abundancia)	Fragmento B m/z (abundancia)
PYP1	H	H	297 (39%)	239 (100%)
PYP2	H	CH ₃	311 (100%)	239 (85%)
PYP3	H	Cl	331 (47%)	239 (100%)
PYP5	NO ₂	H	342 (100%)	239 (55%)

Los compuestos **PYP1**, **PYP2**, **PYP3** y **PYP5** se analizaron mediante espectroscopia de IR mostrando una banda pequeña en un rango de 3220-3390 cm^{-1} correspondiente a NH de la amida, la banda correspondiente al estiramiento de C=O aparece en todos los casos en el rango de 1650-1690 cm^{-1} . También se observó la banda característica de la vibración por el estiramiento asimétrico del -CH₃ en el rango de 2920-2940 cm^{-1} .

La presencia del grupo NO₂ en el compuesto **PYP5** se comprobó mediante las bandas características a los estiramientos asimétrico y simétrico de este grupo en 1513 y 1343 cm^{-1} , respectivamente.

7.1.3. Obtención de las carboxamidas finales **PYP4** y **PYP7**.

De igual manera que para los compuestos anteriores, la obtención de las carboxamidas finales **PYP4** y **PYP7** se llevó a cabo a partir el ácido carboxílico **11** vía la formación del cloruro de ácido siguiendo la ruta sintética mostrada en el **Esquema 3**. Para obtener el compuesto **PYP4** se hizo reaccionar el cloruro de ácido con carbazato de *tert*-butilo en THF durante 12 horas a temperatura ambiente. La carboxamida final **PYP4** también se utilizó como precursor para generar **PYP7** mediante la eliminación del grupo *tert*-butilo con HCl/dioxano, una vez que se generó la hidracina, está se hizo reaccionar durante 12 horas y a temperatura ambiente con 5-nitofuran-2-carbaldehído para obtener el compuesto final **PYP7**.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El compuesto 2-[[6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-il]carbonil]hidrazinocarboxilato de *tert*-butilo (**PYP4**) se caracterizó mediante espectroscopia de RMN ^1H donde se observó una señal a 1.438 ppm que integró para nueve hidrógenos asignada a los tres metilos del grupo $-\text{O}(\text{CH}_3)_3$; además se observaron los hidrógenos de la parte bencimidazólica en los desplazamientos esperados y además dos señales amplias en 9.023 y 9.983 ppm, cada una integró para un hidrógeno y cuando se hizo el intercambio con D_2O se comprobaron los hidrógenos de N-H de amida. En el espectro de RMN ^{13}C se observaron las 13 señales esperadas para la molécula, con la señal correspondiente a *tert*-butilo en 28.16 ppm y a 168 ppm una señal asignada al C=O. En el espectro de masas se observó el pico base con m/z de 239 (100%) que se asignó al fragmento con la pérdida $\text{HNNHCO}_2(\text{CH}_3)_3$. El espectro de IR mostró dos bandas en 1708 y 1692 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace C=O del éster y la amida, y una banda en 1164 cm^{-1} asignada a los estiramientos de los enlaces presentes en R-CO-O-R, además se observó la banda en 3386 cm^{-1} característica del estiramiento del enlace N-H de amida.

El compuesto 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-*N*-[[5-nitrofurano-2-il]metileno]-1H-bencimidazol-5-carboxilato (**PYP7**) resultó ser la mezcla de los isómeros *E* y *Z*, esto se observó en el espectro de RMN ^1H . En el caso del isómero *E* el singulete a 7.798 ppm que integró para 1H se asignó al hidrógeno del grupo N=CH; además se identificaron los H-3' y H-4' del nitrofurano mediante la presencia de un singulete en 8.235 ppm y la presencia de un doblete en 7.235 ppm con $J=3.6$ Hz respectivamente. Para el isómero *Z*, la señal simple a 7.570 ppm se identificó con la correspondiente al N=CH; también se identificaron los H-3' y H-4' del nitrofurano mediante la presencia de un doblete en 7.663 ppm con $J=3.6$ Hz y la presencia de un doblete en 6.967 ppm con $J=3.2$ Hz respectivamente. Adicionalmente, se observó una señal a campo bajo en 12.253 ppm correspondiente al hidrógeno del grupo N-H de la amida que desapareció cuando se hizo intercambio con D_2O . En el espectro de RMN ^{13}C se observaron las señales correspondientes para la mezcla de isómeros presentes. En el espectro de masas se comprobó la masa del compuesto y la pérdida del fragmento $-\text{HNNC}$ -nitrofurano correspondió al ion de m/z de 239 (100%). En el espectro de IR se observó la banda a 1349 cm^{-1} característica de las vibraciones Ar-NO₂, también se observó la banda característica al estiramiento C=O de amida en 1653 cm^{-1} .

7.2 Parte biológica

7.2.1. Ensayos de inhibición enzimática *in vitro* en la enzima Triosafosfato isomerasa

La evaluación de la capacidad inhibitoria de las carboxamidas obtenidas se realizó en las TIM de *T. cruzi* (TcTIM) y *T. brucei* (TbTIM). En la **Tabla 8** se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 8. Actividad inhibitoria de los compuestos de la serie **PYP** en la enzima TIM

Compuestos	% actividad inhibitoria	
	TcTIM (200 µM)	TbTIM (200 µM)
PYP1	0	0
PYP2	0	0
PYP3	4	0
PYP4	0	0
PYP5	16	0
PYP7	5	0

Para la TIM de *T. cruzi* los compuestos presentaron muy baja o una nula actividad, siendo **PYP5** el más activo de la serie, ya que inhibió en 16% la actividad de la enzima.

En el caso de la TIM de *T. brucei* todos los compuestos presentaron nula actividad inhibitoria.

El diseño de la serie PYP se basó en algunas carboxamidas evaluadas contra TIM de *T. cruzi* (**CMC-17** y **CMC-19**) que presentaron de regular a buena actividad frente a esta enzima 40 y 50% (100 µM), respectivamente.⁵² Dada la semejanza estructural de las nuevas carboxamidas con los híbridos **CMC-17** y **CMC19**, se esperaría que los nuevos compuestos tuvieran cierta capacidad inhibitoria de la TcTIM; sin embargo, la actividad sobre las enzimas fue muy pobre o nula, por lo que podemos suponer que la principal limitante de la actividad sobre la enzima es la baja solubilidad de los compuestos de la serie **PYP** en las condiciones de la evaluación.

Es importante señalar que desafortunadamente al tiempo de este reporte, no se ha evaluado la actividad contra el protozooario *T. cruzi* en ensayos *in vitro*. De resultar activos o moderadamente activos, el mecanismo por el cual estarían actuando estos compuestos sería diferente para el cual fueron diseñados.

7.2.2. Ensayos de susceptibilidad *in vitro* en protozoarios

Las carboxamidas **PYP1**, **PYP2**, **PYP3**, **PYP4**, **PYP5** y **PYP7** se sometieron a ensayos de actividad *in vitro* contra *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T. vaginalis*. Se midió la susceptibilidad (CI_{50}) de estos protozoarios a los compuestos mediante el método de subcultivos. En la **Tabla 9** y el **Gráfico 1** se muestran los resultados de la evaluación *in vitro*.

Tabla 9. Actividad antiprotozoaria *in vitro* y $1/CI_{50}$ de las carboxamidas **PYP1**, **PYP2**, **PYP3**, **PYP4**, **PYP5** y **PYP7**, y de fármacos de referencia

Compuesto	<i>E. histolytica</i>		<i>G. intestinalis</i>		<i>T. vaginalis</i>	
	CI_{50} (μ M)	$1/CI_{50}$	CI_{50} (μ M)	$1/CI_{50}$	CI_{50} (μ M)	$1/CI_{50}$
PYP1	0.0345	28.98	0.3455	2.894	0.0120	83.33
PYP2	0.0418	23.92	0.0158	63.29	0.0288	34.72
PYP3	0.0408	24.51	0.0122	81.97	0.3676	2.72
PYP4	0.0485	20.61	0.0566	17.66	0.0283	35.34
PYP5	0.0092	108.69	0.0079	126.58	0.0410	24.39
PYP7	0.0266	37.59	0.0292	34.25	0.0132	75.96
Albendazol (ABZ)	56.33	0.02	0.038	26.32	3.39	0.29
Metronidazol (MTZ)	0.350	2.86	1.226	0.82	0.236	4.24
Nitazoxanida (NTZ)	0.055	18.18	0.013	76.92	0.110	9.09

En general los compuestos mostraron buena actividad antiprotozoaria, algunos en el orden nanomolar, el compuesto más potente fue **PYP5**.

En los ensayos contra *E. histolytica*, todos los compuestos sintetizados fueron superiores en potencia a los fármacos usados para el tratamiento de esta parasitosis (MTZ y NTZ) y por consiguiente mucho más activos que el ABZ, el cual no está clasificado como amebicida. La carboxamida **PYP5** fue el compuesto que presentó la mayor actividad de todos los compuestos de la serie, mientras que **PYP4** fue el que presentó la menor actividad. Los

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

resultados indican que es necesaria la presencia de un grupo aromático heterocíclico para obtener el efecto amebicida, característica estructural que el compuesto **PYP4** no posee.

Contra *G. intestinalis*, todos los compuestos fueron superiores en potencia al MTZ, los compuestos **PYP2**, **PYP3**, **PYP5** y **PYP7** resultaron más potentes que ABZ, mientras que únicamente los compuestos **PYP3** y **PYP5** fueron más activos que NTZ.

Respecto a los ensayos contra *T. vaginalis* casi todos los compuestos fueron superiores en potencia a los fármacos de referencia, con excepción de **PYP3** que resultó 1.5 y 3.3 veces menos activo que MTZ y NTZ respectivamente.

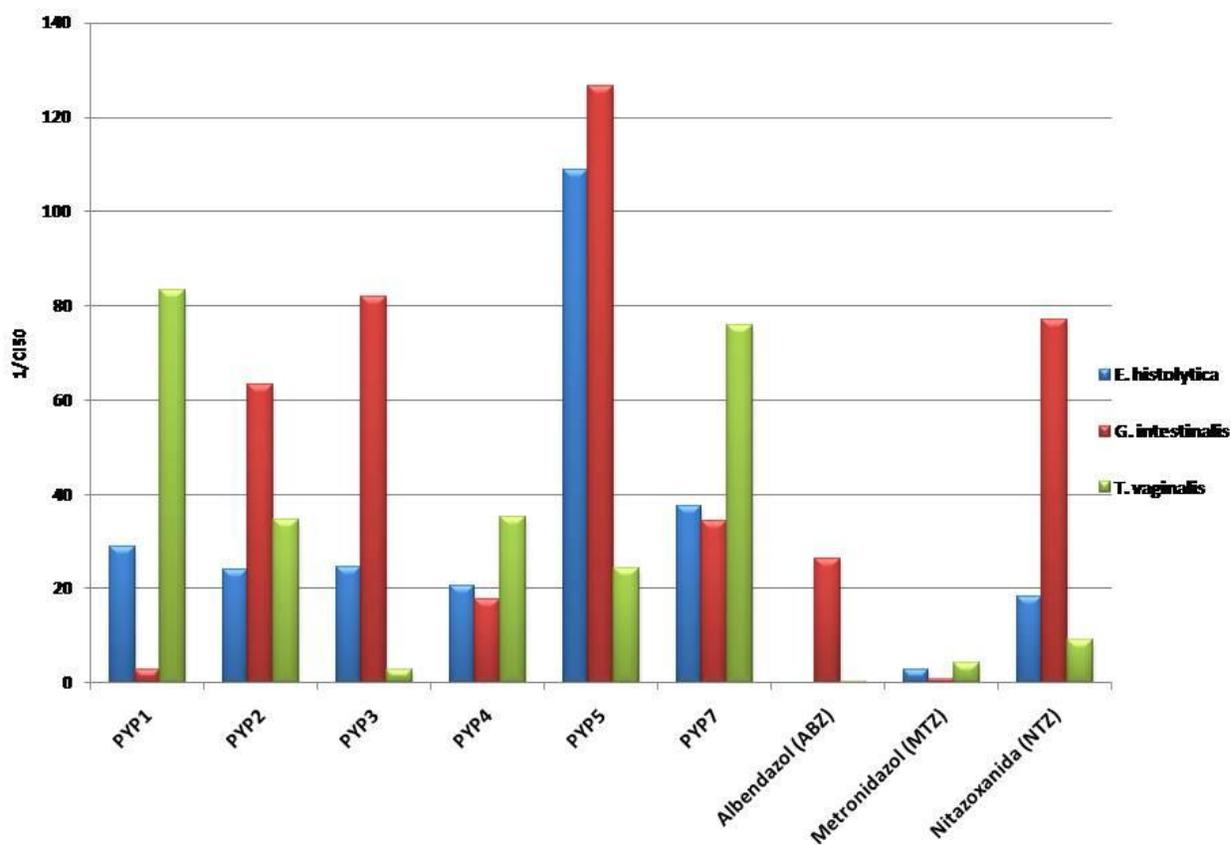


Gráfico 1. Comparación de las potencias observadas de los compuestos de la serie **PYP** en *E. histolytica*, *G. intestinales* y *T. vaginalis*.

Cabe destacar que el compuesto **PYP5** resultó un potente amebicida y giardicida superando a los tres compuestos de referencia. Es probable que la presencia del grupo nitro en la carboxamida **PYP5** contribuya de manera importante en el incremento de la potencia observada, debido a que este grupo confiere efecto oxidante que puede afectar de manera significativa la supervivencia de los protozoarios estudiados. Si bien el compuesto **PYP7** también posee un nitroheterociclo, éste se trata de un anillo más pequeño, un furano.

Con base en los resultados obtenidos, los compuestos muestran ser potentes agentes antiprotozoarios.

El diseño de estos compuestos surgió de la modificación estructural del heterociclo de las carboxamidas híbridas, **CMC-17**, **CMC-19** previamente reportadas. El compuesto **PYP5** tiene una relación estructural más cercana con las carboxamidas híbridas que sirvieron para el diseño de los compuestos reportados en este trabajo, especialmente con el compuesto **CMC-19**, en donde se modificó la parte del 5-nitrotiazol por 3-nitropiridina en **PYP5**. Esta modificación mejoró ligeramente la actividad antiprotozoaria, especialmente contra *G. intestinalis*, en donde **CMC-19** presentó una CI_{50} de 0.010 μM ,⁵⁶ mientras que **PYP5** de 0.0078 μM . Por lo que se puede decir que la modificación del heterociclo, en especial por un anillo de piridina, fue exitosa para mejorar la actividad antiprotozoaria.

Por otro lado, los compuestos **PYP1** y **PYP7** resultaron más activos en la evaluación contra *T. vaginalis*. En este caso el grupo nitro parece no tener una influencia directa en la actividad biológica, este fenómeno también puede observarse en los compuestos **CMC-17** y **CMC-19**, moléculas que difieren entre sí por la presencia o ausencia de un grupo nitro en el anillo de tiazol, y que también fueron evaluados contra *T. vaginalis*, cuyos valores de CI_{50} reportados son similares, esto es: 0.015 μM para **CMC-17** y 0.016 μM para **CMC-19**. El mecanismo de acción de los compuestos **PYP1** y **PYP7** se desconoce, sin embargo cabe la posibilidad que actúen en diferentes blancos farmacológicos.

Los resultados obtenidos proporcionan información muy importante para posteriores estudios de correlación estructura actividad, y que permitan el desarrollo de compuestos más activos. Se requieren más estudios para determinar el mecanismo por el cual estos compuestos ejercen su mecanismo de acción antiprotozoaria.

7.3. Parte computacional

7.3.1. Estudios de acoplamiento molecular (*docking*) de los compuestos de la serie PYP

Debido a que el diseño de las carboxamidas de la serie **PYP** se basó en un estudio de *docking* sobre la enzima TcTIM y a que se pudo contar con la evaluación de la capacidad inhibitoria de TcTIM y además de la TbTIM; en esta parte del trabajo decidimos estudiar, de una forma teórica, el modo de interacción que tiene las carboxamidas de la serie **PYP** al acoplarse con en el sitio de unión propuesto en la interfaz de las TIM's de *T. cruzi*, *T. brucei* y *H. sapiens*.

Se repitió lo ya realizado con la TcTIM para completar el estudio. Además de identificar los residuos que participan en la interacción con los ligandos y la energía teórica con la cual se unen los compuestos a la enzima.

A continuación se muestran los resultados obtenidos del docking con las TIM de los protozoarios y humano en términos de energía de unión, así como también se muestran las representaciones del acoplamiento preferencial de las moléculas con cada una de las TIM's.

En la **Tabla 10** se muestra la energía de unión de los ligandos pertenecientes a la serie **PYP** y de algunos compuestos de la serie **CMC**⁵⁶ con la TIM de los protozoarios (*T. cruzi* y *T. brucei*) y el humano (*H. sapiens*).

Tabla 10. Energía de unión de los compuestos de la serie **PYP** y análogos de importancia con la TIM de *T. brucei*, *T. cruzi* y *H. sapiens*

Compuestos	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)		
	TbTIM	TcTIM	HsTIM
PYP1	-5.93	-7.03	-6.81
PYP2	-6.47	-7.10	-7.13
PYP3	-6.54	-7.14	-6.97
PYP4	-6.49	-6.57	-6.62
PYP5	-7.31	-7.07	-7.80
PYP7	-7.35	-8.95	-7.75
CMC17	-5.75	-7.51	-6.38
CMC19	-7.23	-7.72	-7.85

Los compuestos mostraron afinidad por la enzima con valores de ΔG negativos, indicando que la formación de los complejos enzima-ligando es estable. Los compuestos **PYP5** y **PYP7** fueron los más afines por las tres enzimas, con valores semejantes a los obtenidos para el compuesto **CMC19** que coincide con los primeros en tener un grupo nitro en su estructura.

También se puede ver que las energías calculadas para la HsTIM son muy semejantes a la de los tripanosomas; en algunos casos más negativas que para las de los protozoarios, por lo que las carboxamidas de la serie **PYP** no muestran selectividad por ninguna de las tres enzimas.

Debido a la nula o escasa actividad que presentaron los compuestos de la serie **PYP** al inhibir la TIM de los protozoarios no es posible correlacionar los resultados obtenidos del estudio de acoplamiento molecular con los resultados de la inhibición enzimática sobre las enzimas TIM.

Por otra parte, sin importar los pobres resultados del ensayo de la actividad enzimática de las TcTIM de los compuestos, se decidió analizar el acoplamiento e interacción de los compuestos **PYP3** y **PYP5**, que fueron los que presentaron 4 y 16% de inhibición de la enzima respectivamente, con los residuos de la TcTIM, con el propósito de analizar cómo y con qué residuos sucede la interacción como se muestra en la **Figura 9**.

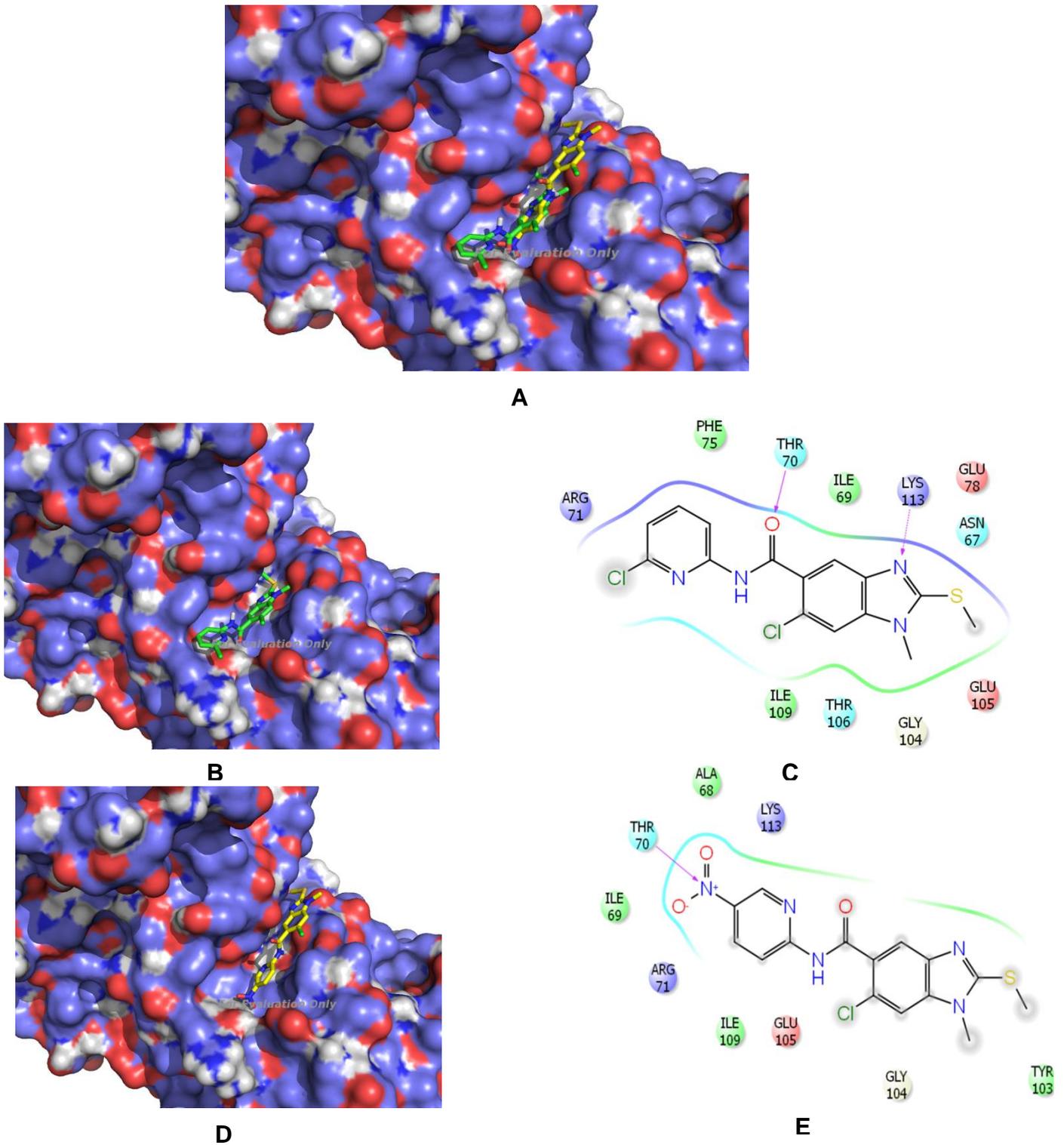


Figura 9. Acoplamiento de las carboxamidas **PYP3** (verde) y **PYP5** (amarillo) con la interfaz de la TIM. **(A)** Representación en mapas de superficie electrostática de la enzima, ligandos en líneas (**PYP3** verde y **PYP5** amarillo). **(B)** Representación en mapas de superficie electrostáticas de la enzima y ligando **PYP3**. **(C)** Representación en 2D de la interacción del ligando **PYP3** con residuos de la interfaz de la enzima. **(D)** Representación en mapas de superficie electrostáticas de la enzima y ligando **PYP5**. **(E)** Representación en 2D de la interacción del ligando **PYP5** con residuos de la interfaz de la enzima.

Como se puede observar, los ligandos **PYP3** y **PYP5** presentan un acoplamiento similar en la interfaz. En el cálculo de las energías de interacción, el compuesto **PYP3** presentó la mayor afinidad, es decir tuvo una energía ligeramente más negativa, esto puede explicarse a la interacción del tipo hidrofóbica entre ligando y los residuos TYR103, GLY 104, GLU105 y ILE 109. Además de la formación de puentes de hidrógenos entre THR70 con el oxígeno del carbonilo y LYS113 con el nitrógeno del núcleo del bencimidazol. En cuanto a **PYP5**, podemos observar que su acoplamiento a la interfaz se encuentra desplazado hacia el interior, en donde el grupo nitro forma un puente de hidrógeno con el residuo THR70; lo que provoca este desplazamiento. Ambos compuestos son estabilizados en el interior de la interfaz de la enzima por el conjunto de residuos aromáticos TYR102 y TYR103 además de otros residuos hidrofóbicos como ILE69, y GLY104.

Cabe destacar que algunos de los aminoácidos de la TcTIM con los que interaccionan los ligandos son diferentes a los HsTIM tiene, por ejemplo VAL69, GLY103, GLU104, SER105, PHE102 y VAL113.

El proceso de la inhibición no competitiva de una enzima es un fenómeno muy complejo en el que están implicados varios pasos. Hasta la fecha, las simulaciones de acoplamiento molecular sólo permiten la predicción de modos de unión y la afinidad de ligandos en macromoléculas, pero estas predicciones no reflejan necesariamente una posible respuesta biológica. Esta respuesta biológica podría estar relacionada con una tendencia no lineal a la concentración del ligando.

Debido a estos hechos, no se espera encontrar una correlación cuantitativa entre los resultados de acoplamiento y el porcentaje de inhibición a una concentración fija; además de los factores fisicoquímicos intrínsecos de las moléculas, tales como solubilidad, pKa, etc.

8. CONCLUSIONES

- ✓ Se sintetizaron e identificaron las seis carboxamidas propuestas, designadas como **PYP1**, **PYP2**, **PYP3**, **PYP4**, **PYP5** y **PYP7**. La formación de las amidas se logró con rendimientos moderados vía la formación del cloruro del ácido. La solubilidad de los compuestos finales dificultó su purificación.
- ✓ Los resultados de inhibición enzimática frente a las TIM de *T. cruzi* y *T. brucei* mostraron que las carboxamidas presentaron nula actividad para *T. brucei* y solamente **PYP3**, **PYP5** y **PYP7** presentaron una ligera actividad para *T. cruzi*. El compuesto **PYP5** fue el más efectivo, inhibió 16 % la actividad de TcTIM.
- ✓ El cálculo de las energías de unión mostró que los compuestos no son selectivos hacia ninguna de las TIM's estudiadas, aunque se puede decir que son ligeramente más afines por la TcTIM.
- ✓ El estudio de acoplamiento molecular sobre las enzimas TIM de *T. cruzi* y *T. brucei* demostró que la carboxamida **PYP5**, con grupo nitro en el anillo de piridina, tiene mejor interacción con los residuos de la enzima, comparado con su análogo activo **PYP3** el cual no posee este grupo.
- ✓ A pesar de los valores de energía favorables encontrados para la unión, la nula o escasa actividad que presentaron los compuestos de la serie **PYP** para inhibir la TIM de los protozoarios, no es posible correlacionar los resultados obtenidos del estudio de acoplamiento molecular con los de la inhibición enzimática.
- ✓ La solubilidad de los compuestos fue un factor determinante que afectó el ensayo de inhibición enzimática, por lo que el estudio de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas que se diseñan por DiFAC debe tomarse en cuenta.

- ✓ Las seis carboxamidas sintetizadas presentaron amplio espectro antiprotozoario ya que fueron activas contra *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *T vaginalis*, algunos más potentes que los fármacos de referencia metronidazol, albendazol y nitazoxanida. El compuesto **PYP5** fue el más activo contra *E. histolytica*, *G. intestinalis* con valores de Cl_{50} nanomolares; y el compuesto **PYP1** contra *T. vaginalis*. El compuesto **PYP4**, carente del heterociclo en la parte amínica de la amida, fue el menos activo de los seis.
- ✓ La introducción del anillo de piridina mejoró la actividad contra los dos protozoarios respecto a los compuestos **CMC-17** y **CMC-19**, los cuales sirvieron para el diseño de los compuestos reportados en este trabajo, por lo que la presencia de un heterociclo aromático en la parte amínica de las moléculas parece ser fundamental para la actividad.
- ✓ Se requieren más estudios para determinar el mecanismo de acción de los compuestos sintetizados.

REFERENCIAS

1. Uribarren, T. (2003). Historia e importancia de las enfermedades parasitarias. En Tay, J. Microbiología y parasitología médicas. 3° edición, Méndez Editores, México, pp. 440-442.
2. Tay, J. (2010). Parasitología médica. 8° edición, Méndez Editores, México, pp. 33-42
3. Report, T.W.H. (2002). Reducing risks, promoting healthy life. Geneva. World Health Organization.
4. Armaganijan, L., Morillo, CA. . (2010). Chagas disease: 101 years of solitude! Time for action. *Stroke*; 41: 2453-2454
5. Schmunis, G., Yadon, ZE. . (2010). Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*; 115: 14-21.
6. Organización Panamericana de la Salud. (2006). Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Montevideo: Organización Panamericana de la Salud. <http://www.bvsops.org> [Consultada Noviembre 2012].
7. Ramsey, J., Tello, A., Pohls, J. . (2003). Iniciativa para la vigilancia y el control de la Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. 1° edición, Instituto Nacional de Salud Pública, México, pp. 13-17.
8. Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M. (2009). Microbiología médica. 6° edición, Elsevier, Barcelona, España, pp. 848-852.
9. Cattand, P., Jannin, J., Lucas, P. (2001). Sleeping sickness surveillance: and essential step towards elimination. *Tropical Medicine and International Health*; 6: 348-361.
10. Organization, W.H. (2006). Weekly epidemiological record. World Health Organization.; 81: 71-79.
11. Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology*; 27: 347-382.
12. Navarro, M., De Lima, A., Askue, J., Contreras, V.(2003). Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 98(1): 83-91.
13. Melo, R.C., Brener, Z. (1978). Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. . *Journal of Parasitology*; 64(3): 475-482.

14. Tyler, K.M., Engman, D.M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*; 31: 472-481.
15. Böhringer, S., Hecker, H. (1975). Quantitative Ultrastructural Investigations of the Life Cycle of *Trypanosoma brucei*: A Morphometric Analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*; 22: 463-467.
16. Legros, D., Ollivier, G., Gastellu-Etchegorry, M., Paquet, C., Burri, C., Jannin, J., Büscher, P. (2002). Treatment of human African trypanosomiasis present situation and needs for research and development. *The Lancet Infectious Diseases*; 2: 437-440.
17. Enanga, B., Burchmore, R.J., Stewart, M.L., Barret, M.P. (2002). Sleeping sickness and the brain. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 59: 845-858.
18. Abad-Franch, F., Paucar, CA., Carpio, CC., Cuba, CA., Aguilar, VHM., Miles, MA. (2001). Biogeography of Triatominae in Ecuador: implications for the design of control strategies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 96: 611-620.
19. Steverding, D., Tyler, K. (2005). Novel antitrypanosomal agents. *Expert Opinion on Investigational Drugs*; 14: 939-955.
20. Lauria-Pires, L., Nitz, N., Vexenat, AC. (2001). The treatment of Chagas' disease patients with nitroderivative is unsatisfactory. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 43(3): 175-181.
21. Maya, J., Cassels, B., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N. (2006). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology* 146(4): 601-620.
22. Apt, W., Zulantaya, I. (2011). On the treatment of Chagas' disease. *Revista Médica de Chile*; 139: 247-257.
23. Bray, P.G., Barrett, M.P., Ward, S.A., de Koning, H.P. (2003). Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends in Parasitology*; 19(5): 232-239.
24. Fairlamb, A.H. (2003). Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends in Parasitology*; 19(11): 488-494.
25. Carter, N.S., *et al.*(1995). Uptake of diamidine drugs by the P2 nucleoside transporter in melarsen-sensitive and -resistant *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*; 270(47): 28153-28157.

26. Shapiro, T.A., *et al.*(1990). Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. *Proceedings of the National Academy of Science*; 87(3): 950-954.
27. Freilij, H., Altecheh, J. (1995). Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clinical Infectious Diseases*; 21(3): 551-555.
28. Vansterkenburg, E.L.M.*e.a.* (1993). The uptake of the trypanocidal drug suramin in combination with low-density lipoproteins by *Trypanosoma brucei* and its possible mode of action *Acta Tropica*: 54: 237-250.
29. Heby, O. *et al.* (2003). Polyamine biosynthetic enzymes as drug targets in parasitic protozoa. *Biochemical Society Transactions*31(2): 415-419.
30. Keiser, J., *et al.* (2000). Investigations of the metabolites of the trypanocidal drug melarsoprol. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*; 67(5): 478-488.
31. Katiyar, S.K.; *et al.* (1994). Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with β -tubulina sequence. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 38(9):2086-2090.
32. Armson, A.; *et al.* (1999).A comparison of the effects of a benzimidazole and the dinitroanilines against *Leishmania infantum*.*Acta Tropica*, 733:303–311.
33. Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*; 3: 935-949.
34. Halperin, I., Ma, B. (2002). Principles of Docking: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins*; 47: 409-443.
35. Goodford, P.J.A. (1985). A computational Procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *Journal of Medicinal Chemistry*; 28: 849-857.
36. Cohen, C. (1990). Molecular modeling software and methods for medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*; 33: 883-894.
37. Kleabe, G. (2006). Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discovery Today*; 11: 580-594.
38. Téllez-Valencia, A., Olivares-Illana, V., Hernández-Santoyo, A., Pérez-Montfort, R., Costas, M., Rodríguez-Romero, A., López-Calahorra, F., Tuena, M., Gómez-Puyou, A. (2004). Inactivation of Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an Agent that Perturbs its Dimer Interface. *Journal of Molecular Biology*; 341: 1355-1365.
39. Cazzulo, J.J. (2002). Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*; 2: 1261-1271.

40. Urbina, J. (2003). New chemotherapeutic approaches for the treatment of Chagas disease (American Trypanosomiasis). *Expert Opinion in Therapeutic Patents*; 13: 661-669.
41. Molina, J., Martins-Filho, O., Brener, Z., Romanha, A.J., Loebenberg, D., Urbina, J.A. (2000). Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 44: 150-155.
42. Fairlamb, A., Cerami, A. (1992). Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annual Review of Microbiology*; 46: 695-729.
43. Michels, P. (1988). Compartmentation of glycolysis in trypanosomes: a potential target for new trypanocidal drugs. *Biology of The Cell*; 64: 157-164.
44. Nowicki, M., Tulloch, L., Worrall, L., McNae, I., Hannaert, V., Michels, P., Forthergill-Gilmore, L., Walkinshaw, M., Turnera, N. (2008). Design, synthesis and trypanocidal activity of lead compounds based on inhibitors of parasite glycolysis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*; 16: 5050-5061.
45. Meyerhof, O., Beck, L.V. (1994). Triosephosphate isomerase. *Journal of Biology Chemistry*; 156: 109-120.
46. Helfert, S. *et.al.* (2001). Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Journal*; 357:117-125
47. Putman, S., Coulson, A.F., Farley, I.R., Riddleston, B., Knowles, J.R. (1972). Specificity and kinetics of triose phosphate isomerase from chicken muscle. *Biochemistry*; 129(2): 301-310.
48. Lolis, E., Alber, T., Davenport, R.C., Rose, D., Hartman, F.C., Petsko, G.A. (1990). Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry*; 29(28): 301-310.
49. Gomez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R.A., Rojo-Dominguez, A., Perez-Montfort, R (1995). Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action - Studies with triosephosphate isomerase. *Chemistry and Biology*; 2: 847-855.
50. Banner, D.W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Willson, I. A., Conan, P. H., Furth, A. J., Milmar, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D., Waley, S. G. (1975).

-
- Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5Å resolution: using amino acid sequence data. *Nature* 255: 609-614.
51. Espinoza-Fonseca, L., Trijullo-Ferrara, J. (2005). Structural considerations for the rational design of selective anti-trypanosomal agents: The role of the aromatic clusters at the interface of triosephosphate isomerase dimer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 328: 922-928.
52. Romo-Mancillas, A., Téllez-Valencia, A., Yépez-Mulia, L., Hernández-Luis, F., Hernández-Campos, A., Castillo, R. (2011). The design and inhibitory profile of new benzimidazole derivatives against Triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*: A Problem of residue motility. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*; 30: 90-99.
53. Pérez-Montfort, R., Garza-Ramos, G., Alcántara, GH., Reyes-Vivas, H., Gao, XG., Maldonado, E., de Gómez-Puyou, MT., Gómez-Puyou, A. (1999). Derivatization of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface. *Biochemistry*; 38(13): 4114-4120.
54. Olivares-Illana, V., Pérez-Montfort, R., López-Calahorra, F., Costas, M., Rodríguez-Romero, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez Puyou, A. (2006). Structural differences in triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multitrypanosomatid inhibitor. *Biochemistry*; 45(8): 2556–2560.
55. Álvarez, G., Aguirre-López, B., Varela, J., Cabrera, M., Merlino, A., López, GV., Lavaggi, ML., Porcal, W., Di Maio, R., González, M., Cerecetto, H., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., de Gómez-Puyou, MT., Gómez-Puyou, A. (2010). Massive screening yields novel and selective *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase dimer-interface-irreversible inhibitors with antitrypanosomal activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 45(12): 5767-5772.
56. Méndez-Cuesta, C. (2005). Tesis de licenciatura. Síntesis y actividad antiparasitaria del 6-cloro-2-(metiltio)-N-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)-1H-bencimidazol-5-carboxamida y sus derivados 1-metilados. Facultad de Química. UNAM. México D.F.
57. Maestro v9.1, Schrödinger, Inc. New York, NY, USA
58. Vriend, G. (1990). WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *Journal of Molecular Graphics*, 8(1):52-56.

59. Van Der Spoel, D.; *et al.* (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16): 1701–1718.
[GROMACS v4.5.3, University of Groningen, Groningen, Netherlands]
60. Deppmeir, B.J.; *et al.* (2002). Spartan'02, version 115a. Wavefunction, Inc.; Irvine, CA.
61. Sanner, M.F. (1999). Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 17: 57-61.
[AutoDock v4.2, North Torrey Pines Road, La Jolla, CA, USA]
62. Sanner, M.F. (1999). Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 17: 57-61.
[AutoDock Tools v1.5.4, North Torrey Pines Road, La Jolla, CA, USA]
63. DeLano, W.L. (2007). The PyMOL Molecular Graphics System; DeLano Scientific LLC: Palo Alto, CA. <http://www.pymol.org>.

APÉNDICE I. PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentación

Las materias primas y reactivos se pesaron en una balanza analítica Santorius y en una balanza granataria SCIENTECH SL600.

Las reacciones de hidrogenación catalítica se realizaron en un hidrogenador marca Parr modelo 3916EG con un vaso reactor de 500 mL de capacidad, adaptado a un tanque de hidrógeno INFRA y como catalizador Ni-Raney marca Aldrich.

El calentamiento de las reacciones se realizó en parrillas de calentamiento y agitación marca IKA-RET.

Los puntos de fusión se determinaron mediante capilar en un aparato Büchi modelo B-540.

La evaporación de los disolventes se llevó a cabo en un rotaevaporador marca Büchi modelo R-205 con baño de calentamiento Büchi B-490, acoplado a una bomba de vacío Büchi modelo V-800 y un condensador de dedo frío conectado a un enfriador Brinkmann IC-30; o bien, en un rotaevaporador R-125 con baño de calentamiento Büchi B-491, conectado a una bomba de vacío Vacuubrand modelo CVC-2 y acoplado a un condensador de dedo frío enfriado por un refrigerante en espiral Brinkmann modelo IC-30.

Los equipos utilizados en las técnicas espectroscópicas y espectrométricas pertenecen a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. La determinación de los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C se realizó en un aparato de resonancia magnética Varian MRS 400 MHz utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, se emplearon disolventes deuterados como dimetilsulfóxido ($\text{DMSO-}d_6$), cloroformo (CDCl_3), piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) y agua deuterada (D_2O) para el intercambio de hidrógenos ácidos; los desplazamientos (δ) se expresan en ppm. Los espectros de masas (EM) se determinaron en un equipo JOEL modelo JMS-SX102 utilizando la técnica de introducción directa (ID) e impacto electrónico (IE), o en un espectrómetro de cromatografía de líquidos de alta resolución Waters Synapt® G2-S acoplado a una fuente de electrospray (ESI).

Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro de transformada de Fourier, marca Perkin Elmer Modelo 1605, mediante la técnica pastillas y reflectancia.

Cromatografía

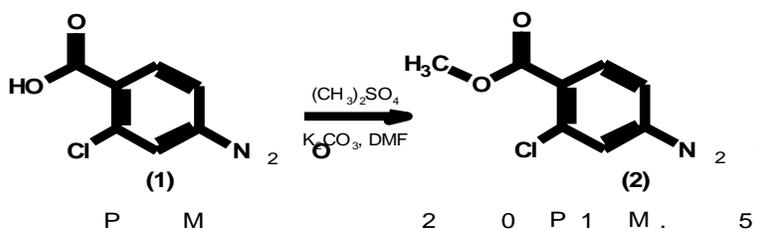
El avance de las reacciones y la pureza de los compuestos se observaron por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60 GF-254 (Merck). Los compuestos orgánicos se visualizaron con luz ultravioleta (UV). Los sistemas utilizados fueron los siguientes:

Sistema	Composición	Proporción
I	Cloroformo-Metanol	95:5
II	Hexano-Cloroformo-Acetato de Etilo	50:35:15
III	Cloroformo-Metanol	90:10
IV	Cloroformo-Metanol	80:10

Para la separación cromatográfica por la técnica de cromatografía en columna Flash se utilizó una columna de vidrio empacada con gel de sílice 60 (Merck), con un tamaño de partícula 0.04-0.063 mm y malla 230 – 400 mesh. La velocidad de flujo se ajustó a 0.07 in²/min mediante una bomba calibrada a 4.0 lb/in² de presión.

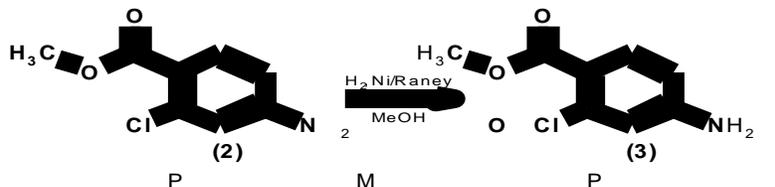
Técnicas para la preparación de intermediarios y productos finales

Síntesis de 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2)



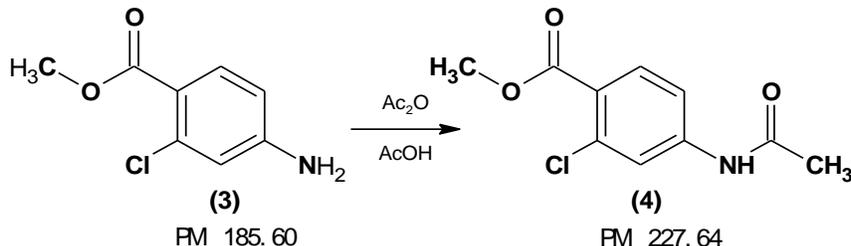
En un matraz bola de una boca esmerilada 24/40 de 50 mL, adaptado a un embudo de adición se suspendieron 10.3 g (3 eq. 0.0744 mol) de carbonato de potasio en 20 mL de DMF a temperatura ambiente. A continuación se adicionaron 5 g (0.02480 mol) de ácido 2-cloro-4-nitrobenzoico (1), en este punto la mezcla se mantuvo en agitación vigorosa durante 10 minutos. Una vez pasado este tiempo, se verificó que el pH estuviera en 7, por lo que se procedió a la adición, mediante goteo continuo, de 4.7 mL (2 eq. 0.0496 mol) de sulfato de dimetilo. Terminada la adición, la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 2 horas 30 minutos, la CCF reveló la presencia del ácido materia prima 1, por lo cual se decidió adicionar 1.17 mL (0.5 eq. 0.0124 mol) más de sulfato de dimetilo y se aseguró que el pH estuviese alcalino (pH 10). Después de una hora de reacción se verificó la ausencia de materia prima, el disolvente se retiró con el rotaevaporador, se agregó agua con hielo al matraz de reacción obteniendo un sólido amarillo claro, éste se separó por filtración al vacío y se lavó repetidamente con agua fría dando 5.32 g (99.50%) de producto crudo. Una muestra 0.73 g se recrystalizó de MeOH dando 0.71 g de cristales amarillos (97%) con $R_f=0.63$ (sistema I) y un p.f. de 76.0-76.5 °C.

Síntesis de 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (3)



En un frasco de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 25 g (0.1159 mol) de 2-cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2) en 250 mL de una mezcla MeOH/AcOEt (70:30), en seguida se adicionaron 7.5 g (30% en peso) de catalizador Ni/Raney, previamente lavado con agua y posteriormente con MeOH. El frasco de hidrogenación se colocó en el hidrogenador, se purgó por triplicado con hidrógeno; la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, con la adición controlada de hidrógeno. Después de 3 horas 30 minutos el consumo de hidrógeno cesó, consumiéndose un total de 545 lb/in²; la CCF demostró la ausencia de la materia prima 2. La mezcla de reacción se filtró en una cama de celita, posteriormente se retiró el disolvente en un rotaevaporador. Se obtuvieron 20.44g (95.02%) de un sólido café claro con Rf= 0.5 (Sistema I) y p.f. de 108.5-109.5°C.

Síntesis de 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4)

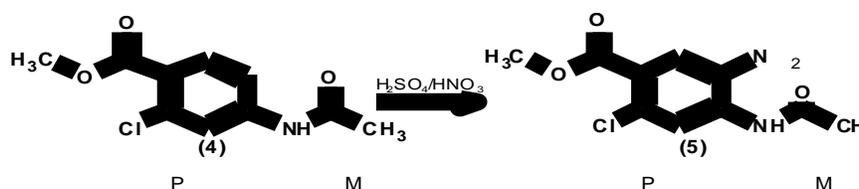


En un vaso de precipitados de 250 mL provisto de termómetro, agitador de vidrio y baño de hielo, se colocaron 20 g (0.1077 mol) de 4-amino-2-clorobenzoato de metilo (3) y 30 mL de ácido acético. Lentamente se adicionaron 10.2 mL (1 eq. 0.1077 mol) de anhídrido acético

APÉNDICE I. PARTE EXPERIMENTAL

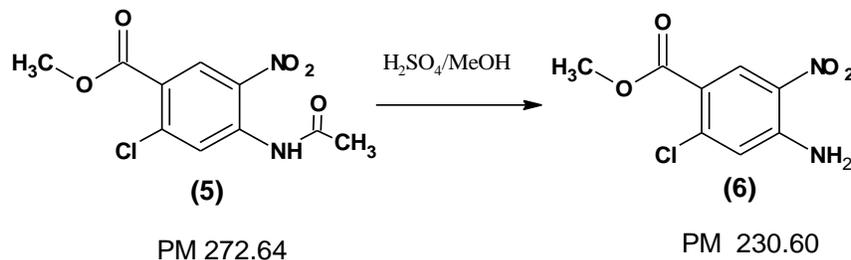
evitando que la temperatura rebasara los 40 °C, terminada la adición la mezcla de reacción se dejó en agitación vigorosa por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo la CCF mostró una conversión total de la materia prima, por lo que la mezcla de reacción se vertió en agua con hielo y se agitó vigorosamente con un agitador de vidrio. El sólido blanco formado se separó por filtración a vacío y se lavó repetidamente con agua fría. Se obtuvieron 22.64 g (92.34%) de producto con un Rf= 0.38 (Sistema I) y p.f. de 114.8-115.4 °C.

Síntesis de 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5)



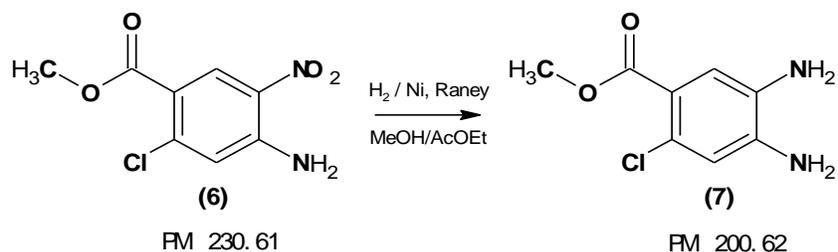
En un vaso de precipitados de 1 L provisto de termómetro, embudo de adición y baño de hielo, se disolvieron 20 g (0.0890 mol) de 4-acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4) en 40 mL de ácido sulfúrico concentrado, manteniendo una agitación vigorosa hasta obtener una solución homogénea y controlando la temperatura por debajo de 12 °C. Se aseguró que la temperatura estuviese entre 0-5°C para posteriormente adicionar, gota a gota, 6.36 mL (1.2 eq. 0.1068 mol) de ácido nítrico, manteniendo la reacción en el rango de temperatura indicado (0-5°C). Al término de la adición, 2 horas 30 minutos, la CCF reveló conversión total de la materia prima y la formación de dos productos en proporción 60:40 aproximadamente. La mezcla de reacción se vertió en 2 L de agua con hielo y se agitó vigorosamente. El sólido se separó por succión, se lavó repetidamente con agua fría y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 22.51 g (92.77%) de un sólido amarillo claro. El producto crudo se recrystalizó de AcOEt obteniendo 18.54 g (82.4%) de cristales amarillos con Rf= 0.72 (Sistema I) y p.f.= 138.9-139.7°C.

Síntesis de 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6)



En un matraz bola de una boca de 500 mL provisto de un condensador, se suspendieron 15 g (0.0550 mol) de 4-acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**5**) en 180 mL de MeOH a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron, gota a gota, 20 mL de ácido sulfúrico. La mezcla de reacción se calentó a reflujo y se mantuvo en agitación constante durante 8 horas. Pasado este tiempo la CCF reveló la conversión total de la materia prima, por lo que la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, dando lugar a la formación de un precipitado naranja y posteriormente se separó por filtración al vacío, se lavó con 50 mL de MeOH y posteriormente con agua, se dejó secar al aire dando 11.23 g (88.54%) de un sólido amarillo-naranja. El producto crudo se recrystalizó de EtOH, obteniendo 9.25 g (82.4%) de cristales de color naranja con $R_f = 0.64$ (sistema I) y un p.f 218.2-221-3°C.

Síntesis de 4,5-diamino-2-clorobenzoato de metilo (7)

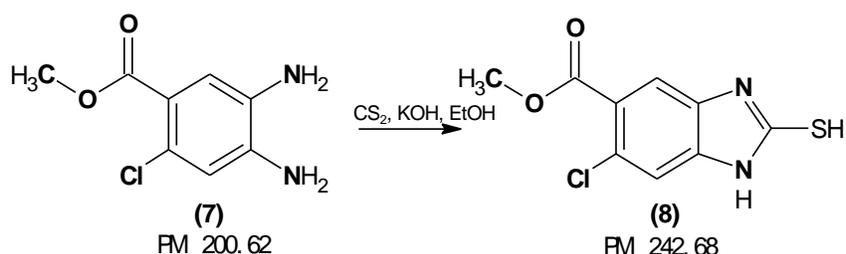


En un frasco de hidrogenación de 500 mL se suspendieron 25 g (0.1084 mol) de 4-amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (**6**) en 250 mL de una mezcla MeOH/AcOEt (70:30) y enseguida se adicionó el 7.5 g de (30% en peso) catalizador Ni/Raney, previamente lavado

APÉNDICE I. PARTE EXPERIMENTAL

con agua y MeOH. Una vez terminada la adición del catalizador el frasco de hidrogenación se colocó en el hidrogenador; el sistema se purgó tres veces con H₂. Durante 3 horas y 30 minutos se llevó a cabo la adición controlada de hidrógeno, a temperatura ambiente; después de tiempo el consumo de hidrógeno cesó y se decidió terminar la reacción. Se consumieron un total de 545 lb/in² de H₂. La CCF demostró la conversión total de la materia prima (2), la mezcla de reacción se filtró en una cama de celita, para retirar el catalizador, y posteriormente se concentró el disolvente en un rotaevaporador. Se obtuvieron 20.11 g (92.47%) de un sólido café claro y con un Rf= 0.23 (Sistema I). El producto sin tratamiento posterior se decidió ocupar en la siguiente reacción.

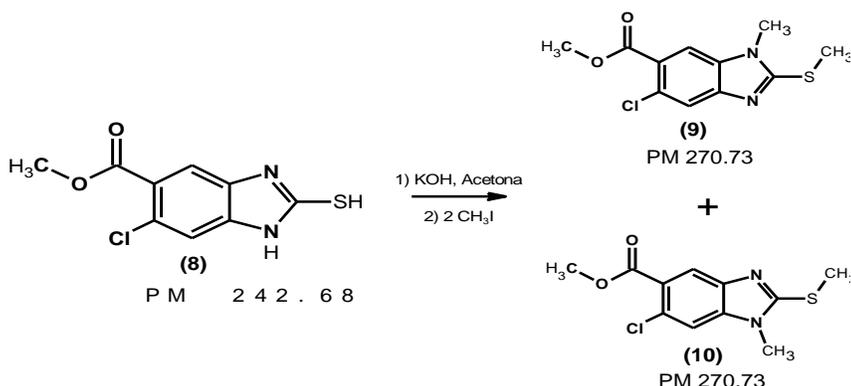
Síntesis de 6-cloro-2-mercapto-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (8)



En matraz de bola de tres bocas de 500 mL, provisto de embudo de adición, condensador en posición de reflujo, termómetro y atmosfera de nitrógeno, se mezclaron 20 g (0.0997 mol) de 4,5-diamino-2-clorobenzoato de metilo (7) en 250 mL de EtOH a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 14 g de KOH (2.5 eq. 0.2492 mol) disueltos en 50 mL de agua. Después de 10 minutos de agitación, se adicionaron lentamente 12 mL (2 eq. 0.1994 mol) de disulfuro de carbono. Una vez terminada la adición, la mezcla de reacción se calentó a una temperatura de 65 °C durante 3 horas. La CCF reveló conversión total de la materia prima. La mezcla de reacción de vertió en agua con hielo y se puso en agitación; luego, se adicionó lentamente ácido acético glacial al 20% hasta pH 5. El sólido formado se separó al vacío, se lavó con agua helada en repetidas ocasiones y se secó al aire. Se obtuvieron 18.92 g (78.20%) de un sólido café claro que en CCF mostró una sola mancha con Rf= 0.33 (Sistema I). Una muestra de 1.52 g se recristalizó en EtOH/DMF obteniendo 1.21 g (80%) de un sólido blanco con un p.f. de 250.1-251°C.

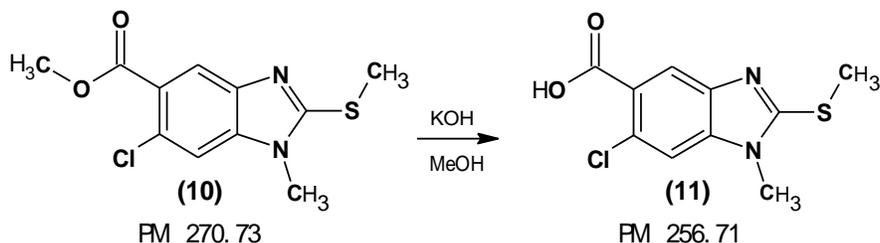
Síntesis de 5-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-6-carboxilato de metilo (9)

Síntesis de 6-Cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (10)



En un matraz de bola de una boca de 100 mL acondicionado con embudo de adición y baño de agua helada (5 °C) se disolvieron 10 g (0.0412 mol) de 6-cloro-2-mercapto-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**8**) en 50 mL de acetona. A la solución se le adicionó 4.85 g de KOH (2.1 eq. 0.0865 mol) disueltos en 10 mL de agua y posteriormente se agregaron, gota a gota, 5.12 mL (2eq. 0.0824 mol) de yoduro de metilo. Terminada la adición de los reactivos, la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 4 horas, después de este tiempo la CCF reveló la conversión total de la materia prima y la presencia de dos productos con $R_{f1} = 0.39$ y $R_{f2} = 0.43$ (Sistema II). La mezcla de reacción se vertió en agua con hielo y se ajustó el pH con ácido acético hasta un valor de 7; posteriormente se filtró al vacío, se lavó repetidas veces con agua y se dejó secar al aire dando 6.93 g (62.12%) de un sólido blanco. Los dos isómeros obtenidos se separaron por cromatografía en columna Flash, utilizando CHCl_3 como fase móvil y gel de sílice como fase estacionaria, con un flujo de 0.7 in/min. Del isómero de interés (compuesto **10**) el de $R_f = 0.39$ se obtuvieron 2.59 g (23.22%). El producto crudo se recrystalizó de EtOH dando 2.18 g (84%) de cristales blancos con un $R_f = 0.39$ (Sistema II) y con un p.f. de 113.3-114.3 °C.

Síntesis de ácido 6-cloro-1-metil-2-metiltio-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (11)



En matraz de bola de dos bocas de 100 mL acondicionado con una columna vigreux y termómetro se mezclaron con agitación 5 g (0.0184 mol) de 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (**10**) en 25 mL de MeOH. Posteriormente se adicionaron 2.1 g (2 eq. 0.0369 mol) de KOH disueltos en 5 mL de agua. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 20 minutos. Pasado este tiempo, la reacción se calentó a 70 °C durante 2 horas. La CCF reveló conversión total de la materia prima, por lo que la mezcla de reacción se vertió en agua con hielo y se ajustó el pH a 4 con ácido acético al 20%. El sólido se separó al vacío, se lavó con agua helada y se dejó secar al ambiente, dando 2.80 g (59.28%) de un sólido blanco, el cual se recrystalizó de EtOH obteniendo 2.68 g (96%) de cristales blancos con $R_f = 0.2$ (Sistema I) y p.f. de 252-253°C.

Método general de síntesis para la obtención de los compuestos PYP1, PYP2, PYP3, PYP4 y PYP5

En un matraz de bola de una boca de 50 mL, acondicionado con una columna vigreux, se agregó 1g (0.0039 mol) de ácido 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxílico (**11**) y 1.71 mL (6 eq. 0.0234 mol) de SOCl_2 . La reacción se agitó y calentó a 40°C durante 3 horas. Una muestra analítica de la mezcla de reacción se derivatizó al éster del bencimidazol **10** por tratamiento con MeOH anhidro, con el propósito de observar la formación completa del cloruro de ácido **11**. Una vez terminada la formación del cloruro de ácido, el exceso de SOCl_2 se retiró mediante destilación azeotrópica con 20 mL de benceno. El residuo seco, se lavó con hexano frío (20 mL x 5), precipitando un sólido que se separó al vacío, y se utilizó de manera inmediata para evitar su hidrólisis debida a la humedad del ambiente. El cloruro

APÉNDICE I. PARTE EXPERIMENTAL

del ácido se colocó en un matraz de una boca de 50 mL, se suspendió en 20 mL de CH₃CN anhidro; a la suspensión se agregaron 1.64 mL (3 eq. 0.0117 mol) de Et₃N y 1 equivalente de la 2-aminopiridina adecuadamente sustituida. La reacción se agitó bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. La reacción se trabajó de acuerdo a sus propiedades.

Síntesis de 6-cloro-1-metil-2-metiltio-*N*-(piridina-2-il)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (PYP1)

Se siguió el método general de síntesis utilizando un equivalente de cloruro de ácido **11**, y 0.36 g (0.0038 mol) de 2-aminopiridina, la reacción se agitó durante 3 horas. Terminada la reacción, el disolvente se retiró con rotaevaporador, obteniendo 0.95 g (75.4%) de un sólido blanco. El producto se purificó por tratamiento con 20% (w/w) de carbón activado en CH₂Cl₂ a reflujo durante media hora. Posteriormente, el producto se recrystalizó por par de disolventes CH₂Cl₂/AcOEt dando 0.64 g (67.4%) de cristales blancos con R_f= 0.56 (sistema III) y punto de fusión de 222.2-223.6°C.

Síntesis de 6-cloro-1-metil-*N*-(6-metilpiridin-2-il)-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (PYP2)

Se siguió el método general de síntesis utilizando 1 equivalente de cloruro de ácido y 0.39 g (0.0041 mol) de 2-amino-6-metilpiridina, la reacción se agitó durante 3 horas. Después, con un rotaevaporador se retiró 70% del volumen inicial del disolvente, luego se agregaron 10 mL de MeOH caliente, se agitó durante 5 minutos, hasta disolución. Finalmente la mezcla se vertió en agua helada, el sólido se separó mediante vacío y se dejó secar dando 0.45 g (34.14 %) de un sólido blanco con R_f= 0.62 (sistema III) y un punto de fusión de 169.3-169.8 °C.

Síntesis de 6-cloro-*N*-(6-cloropiridin-2-il)-1-metil-2-(metiltio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (PYP3)

Se siguió el método general de síntesis utilizando 1 equivalente de cloruro de ácido y 0.50 g (0.0039 mol) de 2-amino-6-cloropiridina, la reacción se agitó durante 3 horas. Terminada la reacción, el disolvente se retiró con rotaevaporador, dando 0.75 g (54%) de un sólido amarillo claro, el cual se purificó mediante cromatografía en columnaflash utilizando como fase móvil

hexano/AcOEt (50:50). Se obtuvieron 0.48 g (38%) de un sólido amarillo con Rf= 0.73 (sistema III) y un punto de fusión de 217.8-218.3°C.

2-[[6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-1H-bencimidazol-5-il]carbonil}hidrazinocarboxilato de *tert*-butilo (PYP4)

Se siguió el método general de síntesis utilizando un equivalente del cloruro de ácido y 0.37g (1.5 eq. 0.0027 mol) de carbazato de *tert*-butilo. La reacción se agitó durante 12 horas. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se vertió en agua con hielo y el sólido formado se separó por filtración al vacío, se lavó repetidas veces con agua helada y se secó al aire dando 0.69 g (95%) de un sólido blanco con Rf= 0.60 (sistema I). El sólido obtenido se recrystalizó de EtOH dando 0.55 g (80%) de un sólido blanco con punto de fusión de 211.4-211.8°C.

Síntesis de 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-*N*-(5-nitropiridin-2-il)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (PYP5)

Se siguió el método general de síntesis utilizando 1 equivalente de cloruro de ácido y 0.54 g (0.0038 mol) de 2-amino-5-nitropiridina, la reacción se agitó durante 2 horas. Después, la mezcla de reacción se separó por filtración al vacío y el sólido se dejó secar al ambiente; se obtuvieron 0.35 g (24.3 %) de un sólido café. El producto se purificó por lavados con CHCl₃, se obtuvieron 0.26 g (74.3%) de un sólido café claro con Rf= 0.69 (sistema III) y p.f de 271.8-272.5°C.

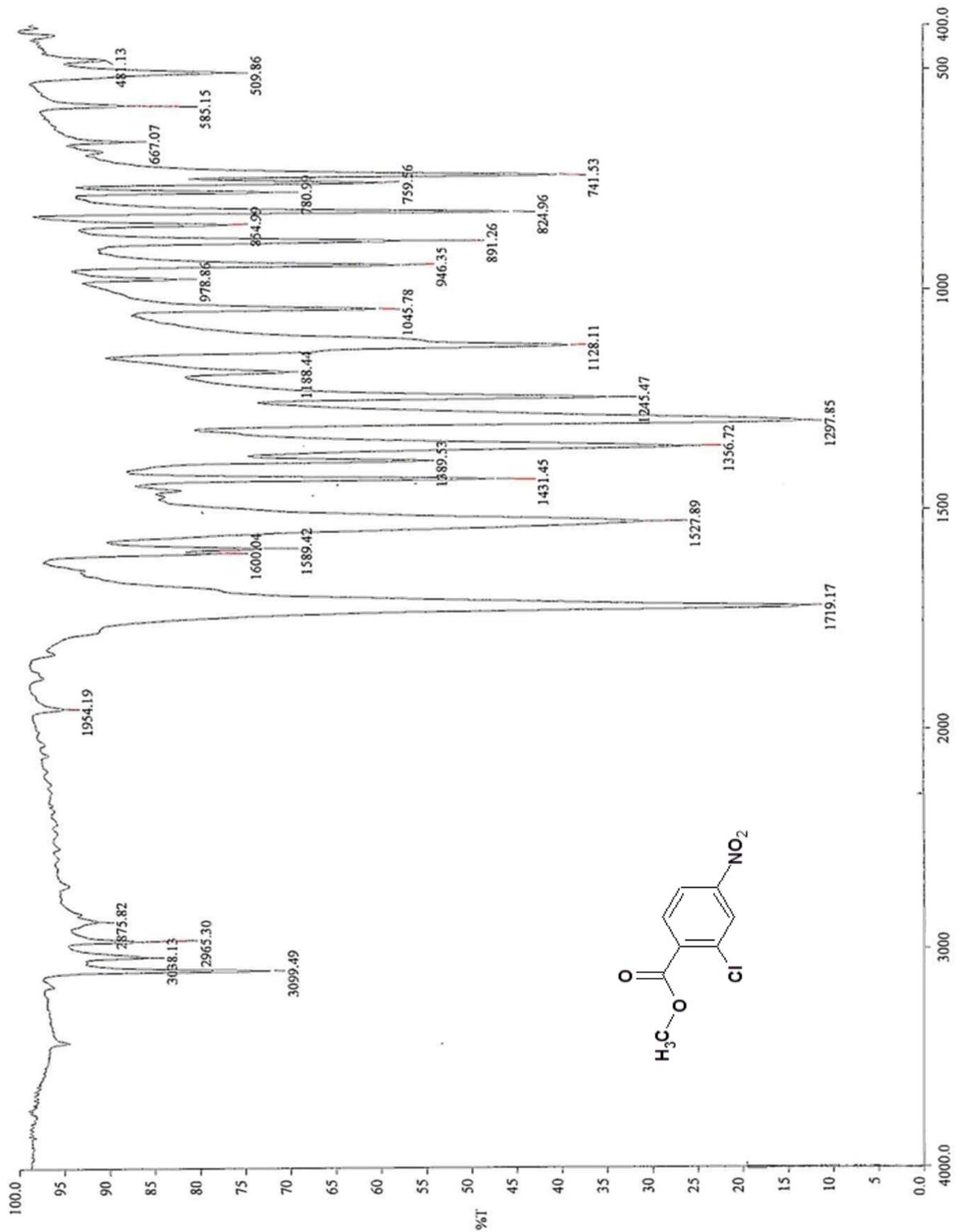
Síntesis de 6-cloro-1-metil-2-(metiltio)-*N*-[(5-nitrofurano-2-il)metileno]-1H-bencimidazol-5-carbohidracida (PYP7)

En un matraz de bola de 50 mL se mezclaron 0.5 g (0.0013 mol) de **PYP4**, 7.0 mL (20 eq. 0.0260 mol) de HCl/Dioxano 4M y 5 mL de THF. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente y en agitación constante bajo atmósfera de nitrógeno durante 48 horas. Después, el disolvente se retiró con rotaevaporador, el sólido obtenido se suspendió en EtOH a temperatura ambiente y se lavó con EtOH (5 mL x 3) y con agua carbonatada en repetidas ocasiones (5 mL x 3); el sólido se filtró al vacío y se secó al aire dando 0.25 g (70%) de un sólido blanco con Rf= 0.67 (sistema IV). El producto se recrystalizó de EtOH obteniendo 0.22 g (90 %) de un sólido blanco con punto de fusión de 250.1-250.6°C.

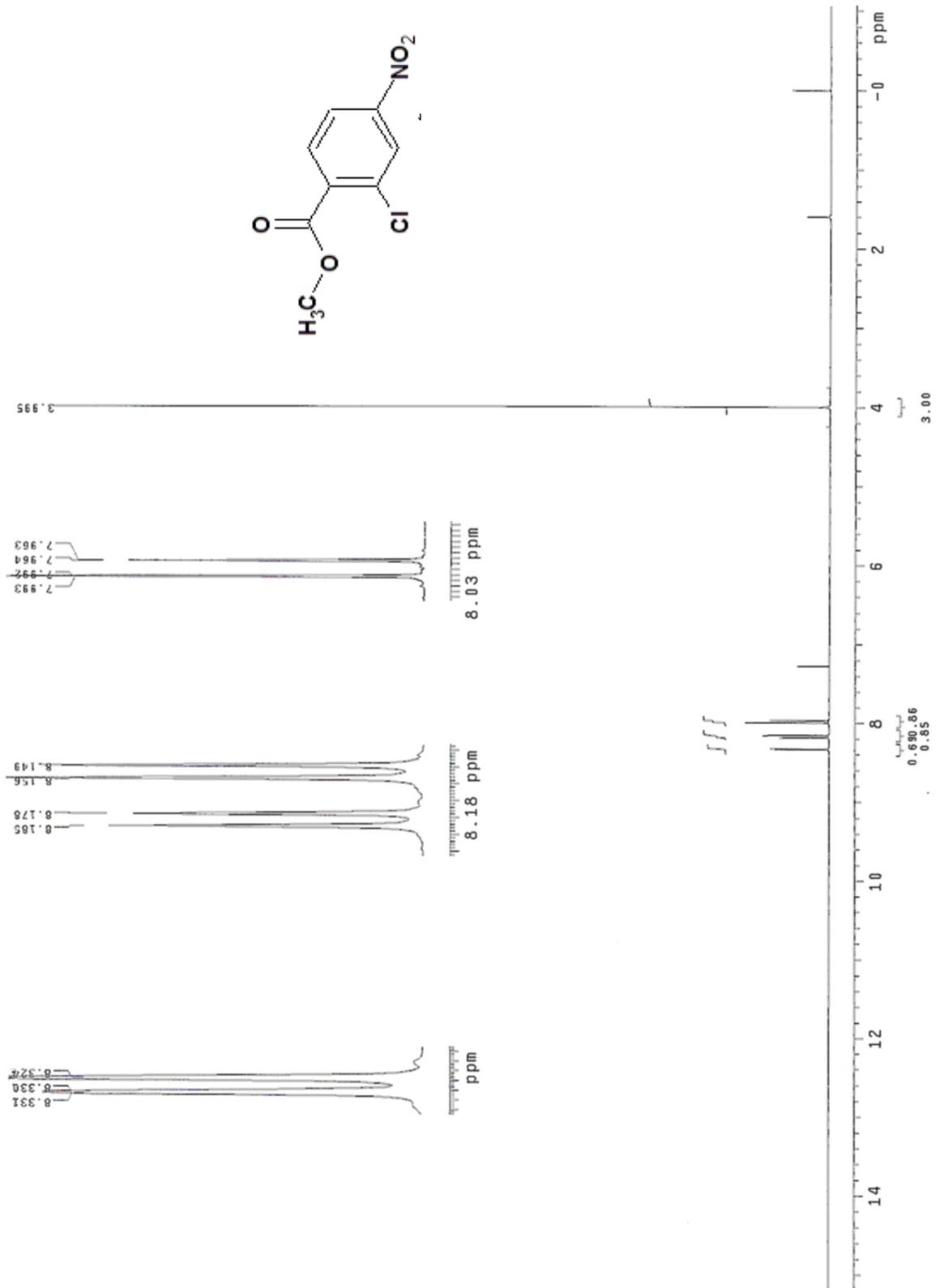
APÉNDICE I. PARTE EXPERIMENTAL

En un matraz de bola de 5 mL se colocaron 0.04 g (0.0001 mol) del producto de hidrólisis obtenido en el paso anterior, el cual se disolvió en 3 mL de una mezcla DMF/EtOH (50:50). A la solución se adicionaron 0.025 g (1.2 equivalentes, 0.00017mol) de 5-nitrofurán-2-carbaldehído y un 1 mL de ortoformiato de trimetilo. La reacción se calentó y agitó a 50 °C durante 48 horas. Luego, el disolvente se retiró con rotaevaporador, al residuo se adicionó una mezcla de agua con hielo y el sólido formado se separó por filtración al vacío y se lavó con agua helada dando 0.05 g (98%) de un sólido amarillo claro con $R_f = 0.72$ (sistema IV), y punto de fusión de 245-249 °C.

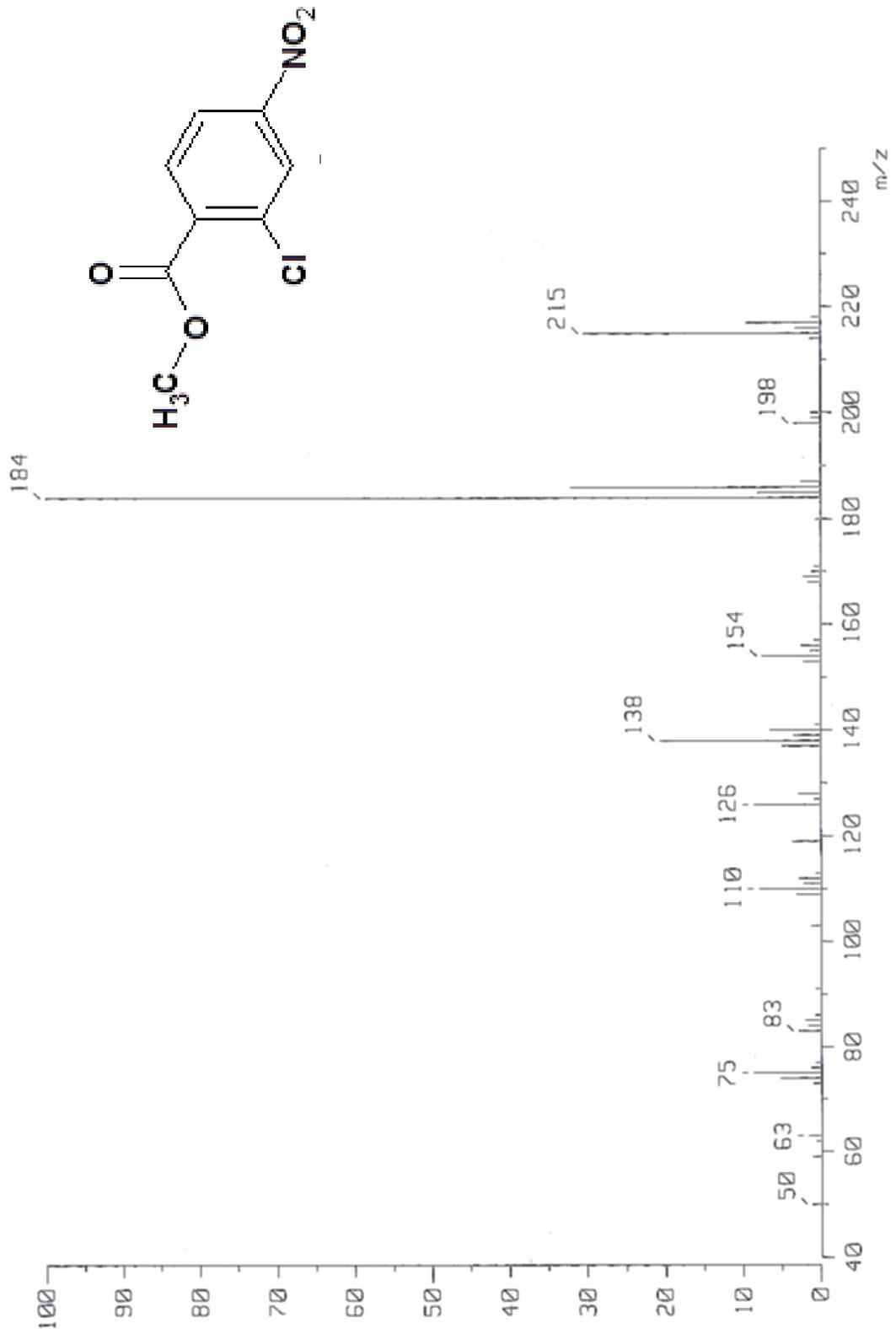
APÉNDICE II. ESPECTROS



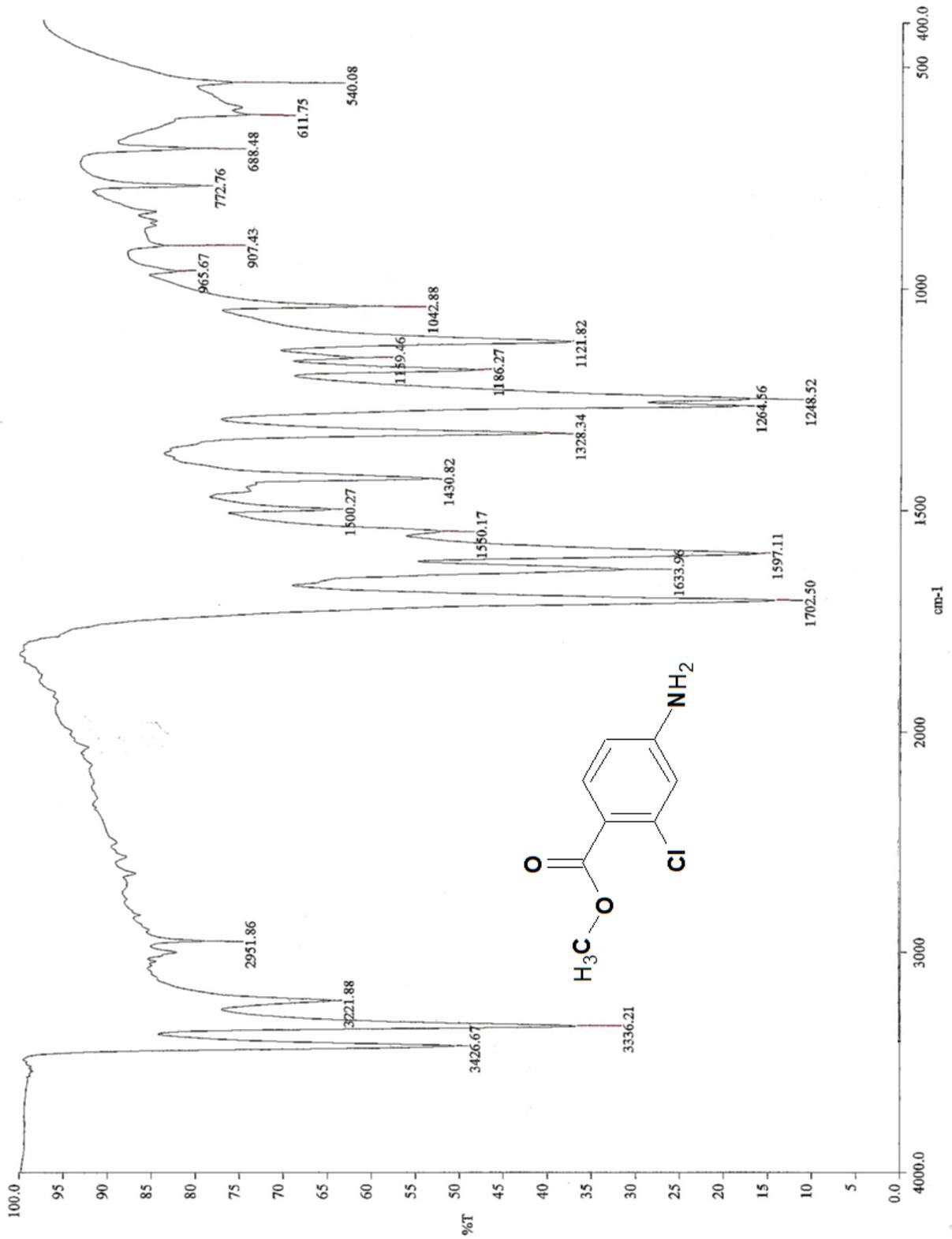
Espectro 1, IR: Pastilla (KBr) cm⁻¹: 2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2).



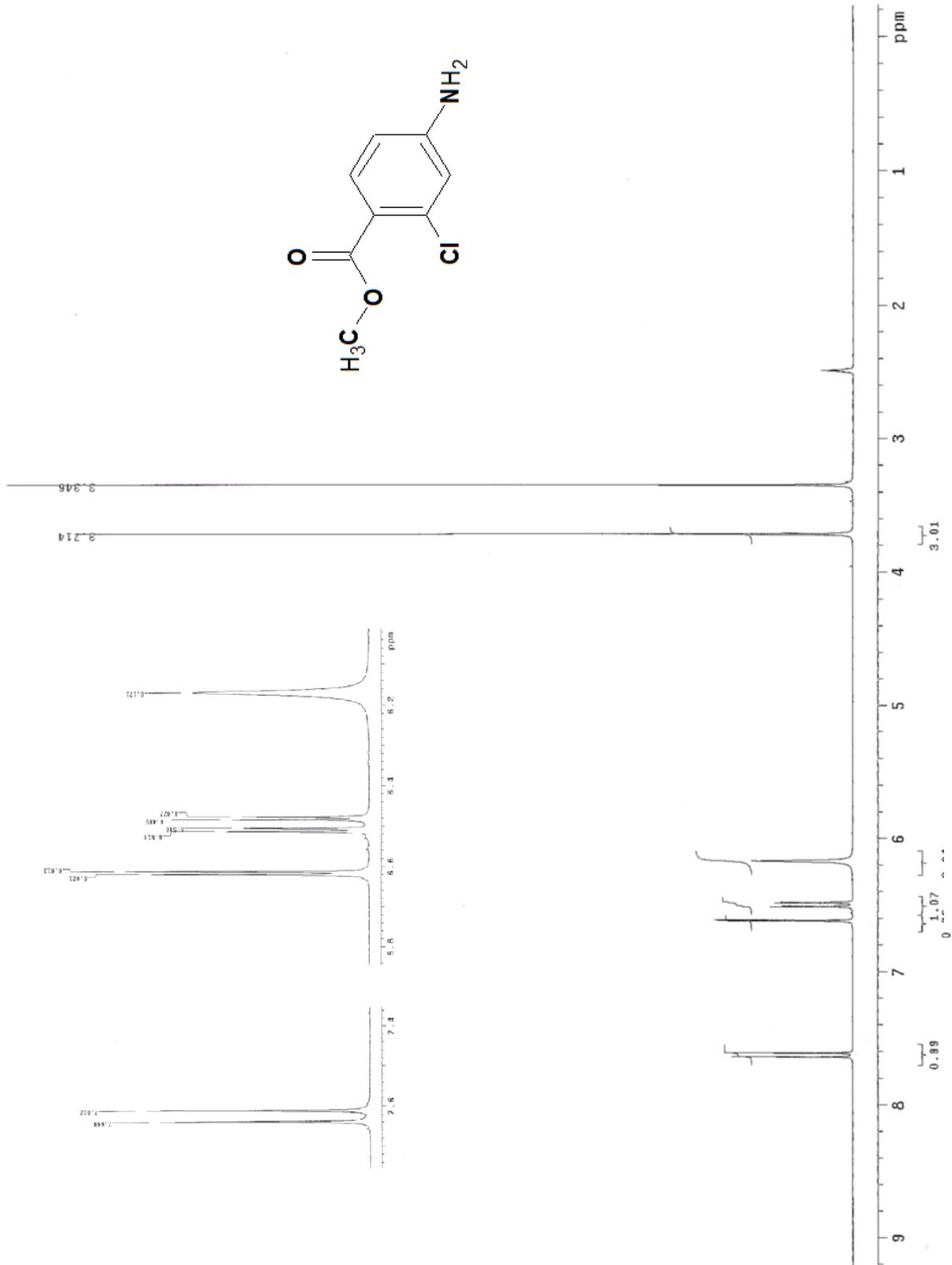
Espectro 2, RMN¹H. (TMS, CDCl₃) ppm: 2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo(2).



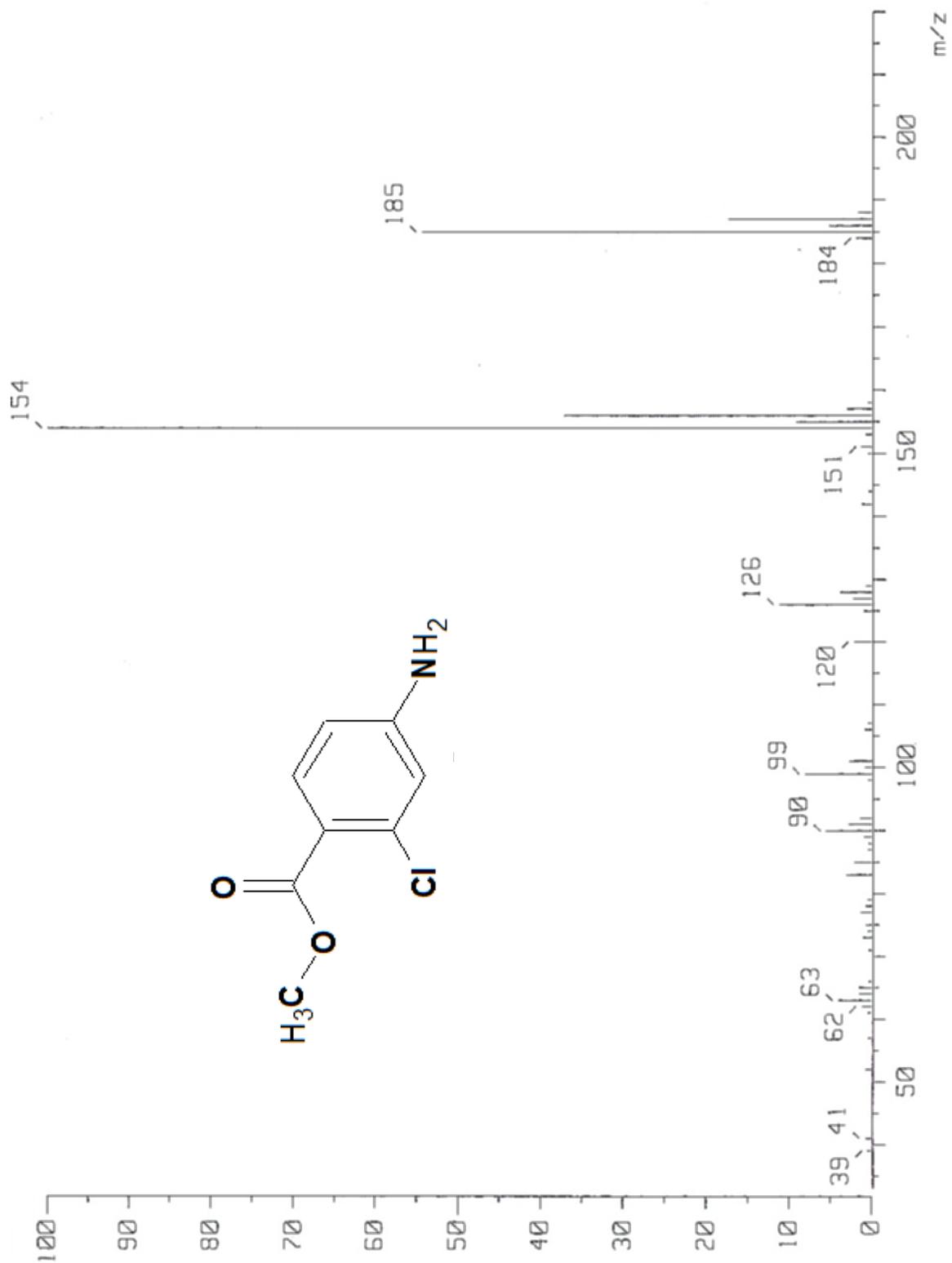
Espectro 3, EM. (IE/ID) *m/z*: 2-Cloro-4-nitrobenzoato de metilo (2).



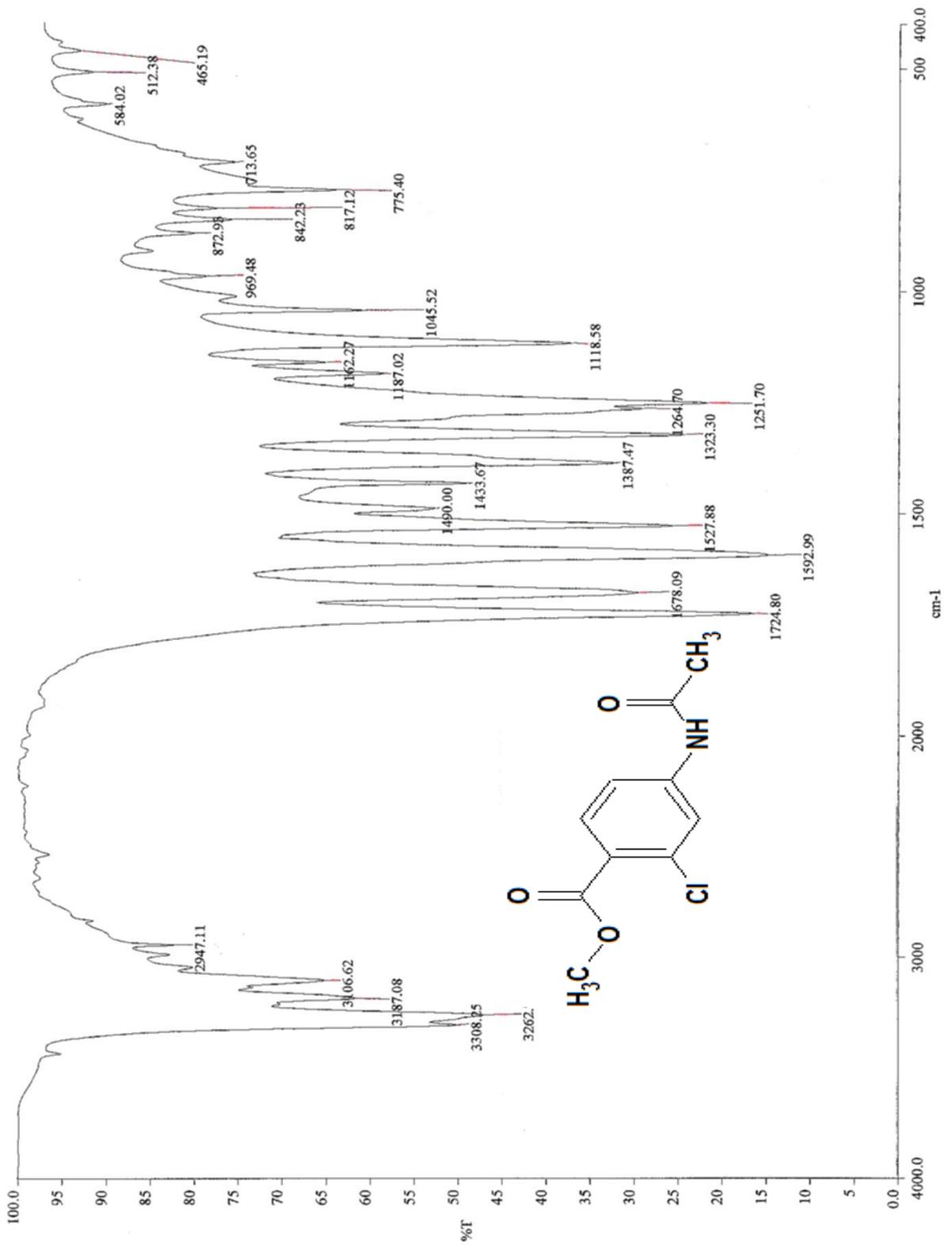
Espectro 4, IR: Pastilla (KBr) cm⁻¹: 4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3).



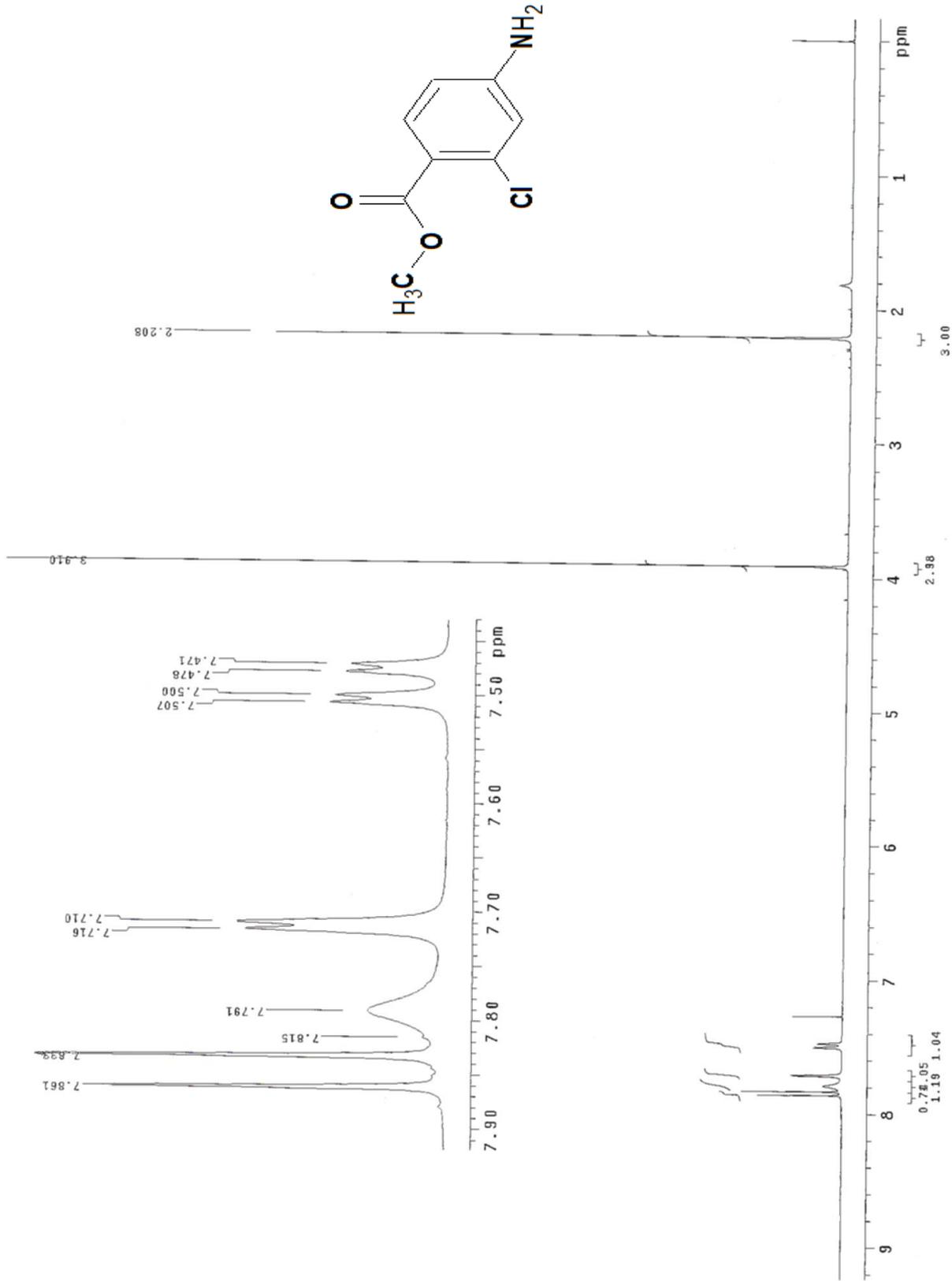
Espectro 5, RMN¹H. (TMS, CDCl₃) ppm: 4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3).



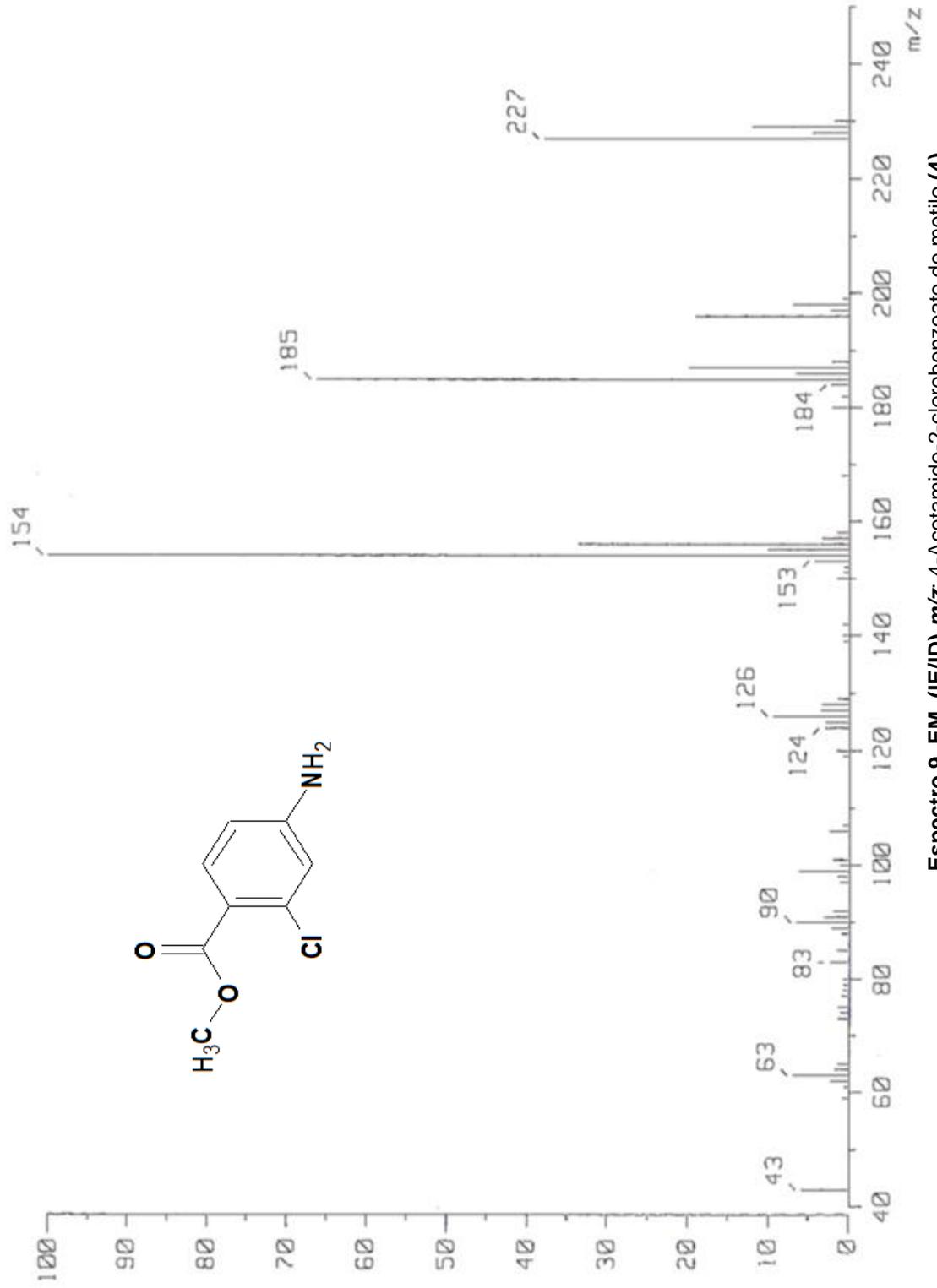
Espectro 6, EM. (IE/ID) *m/z*: 4-Amino-2-clorobenzoato de metilo (3).



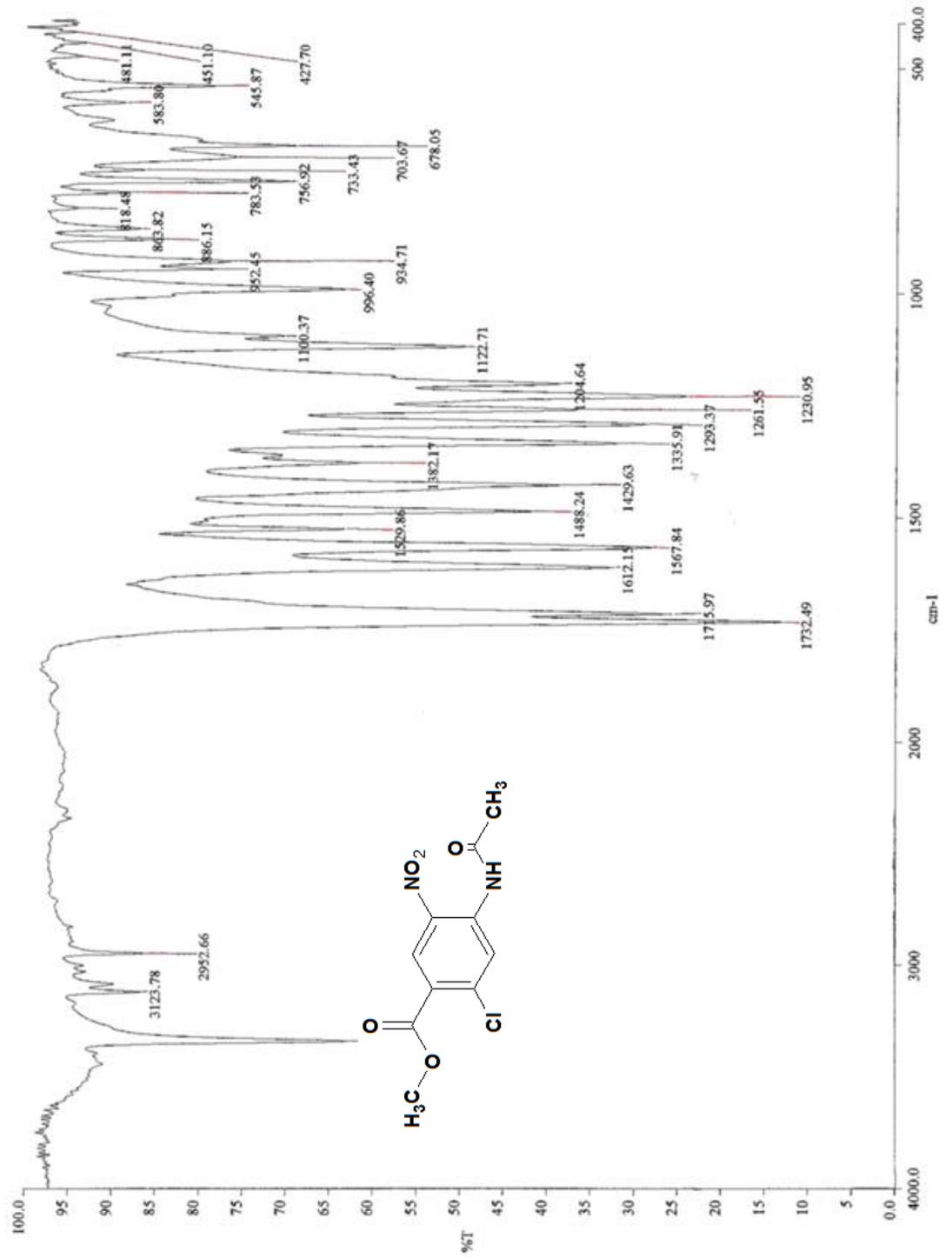
Espectro 7, IR: Pastilla (KBr) cm⁻¹: 4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4).



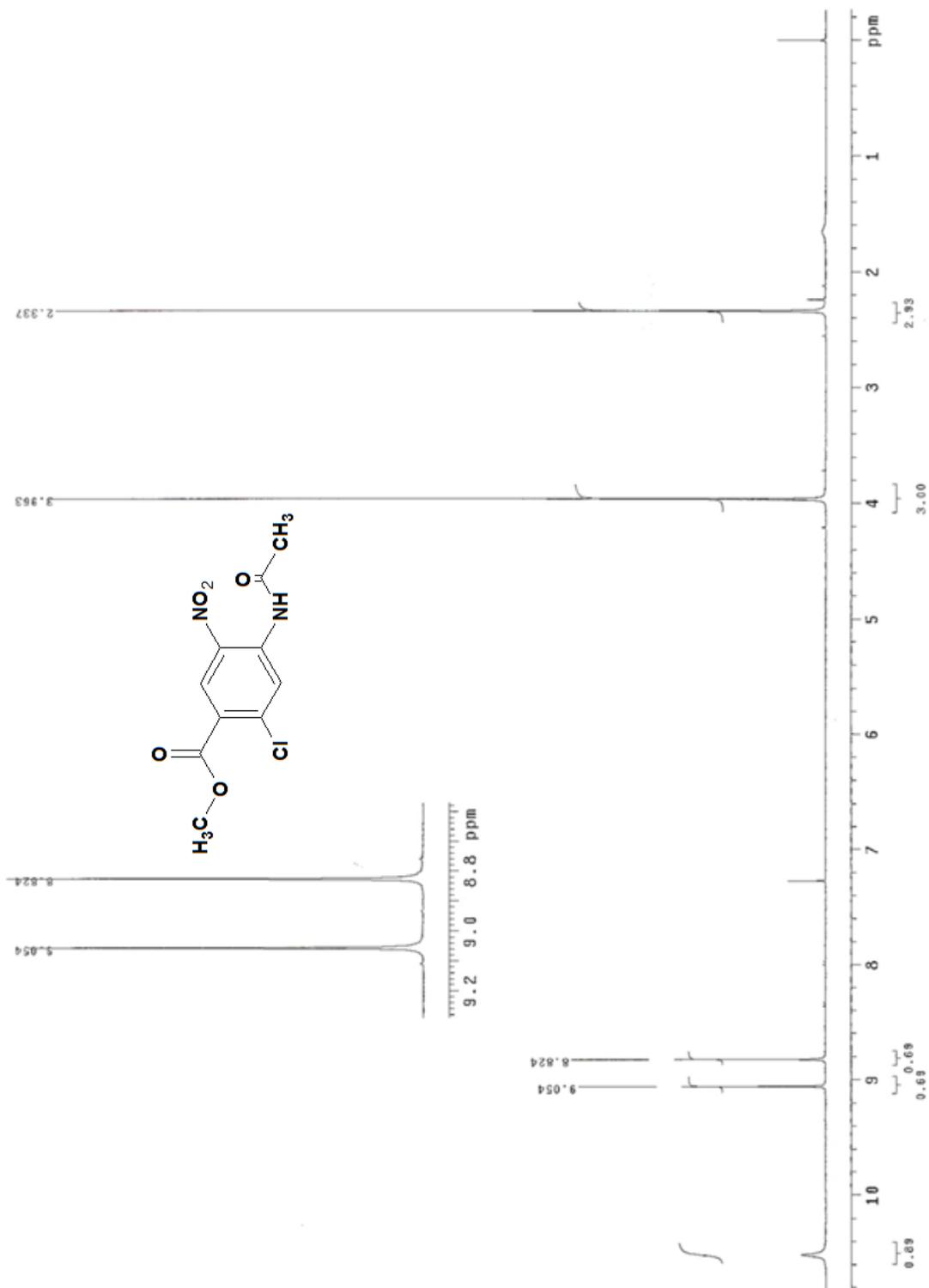
Espectro 8, RMN¹H. (TMS, CDCl₃) ppm: 4-Acetamido-2-clorobenzamidoato de metilo (4).



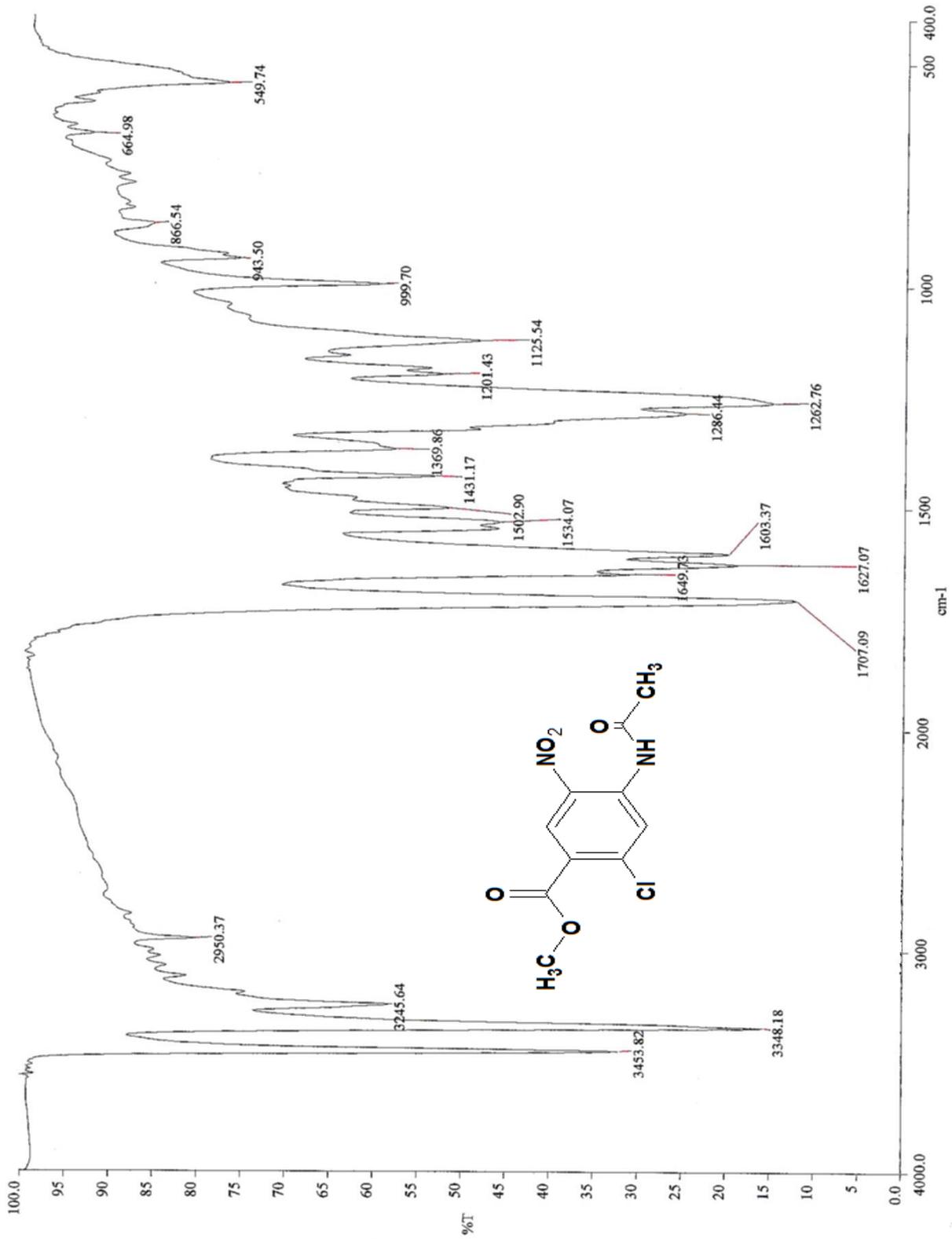
Espectro 9, EM. (IE/ID) m/z. 4-Acetamido-2-clorobenzoato de metilo (4).



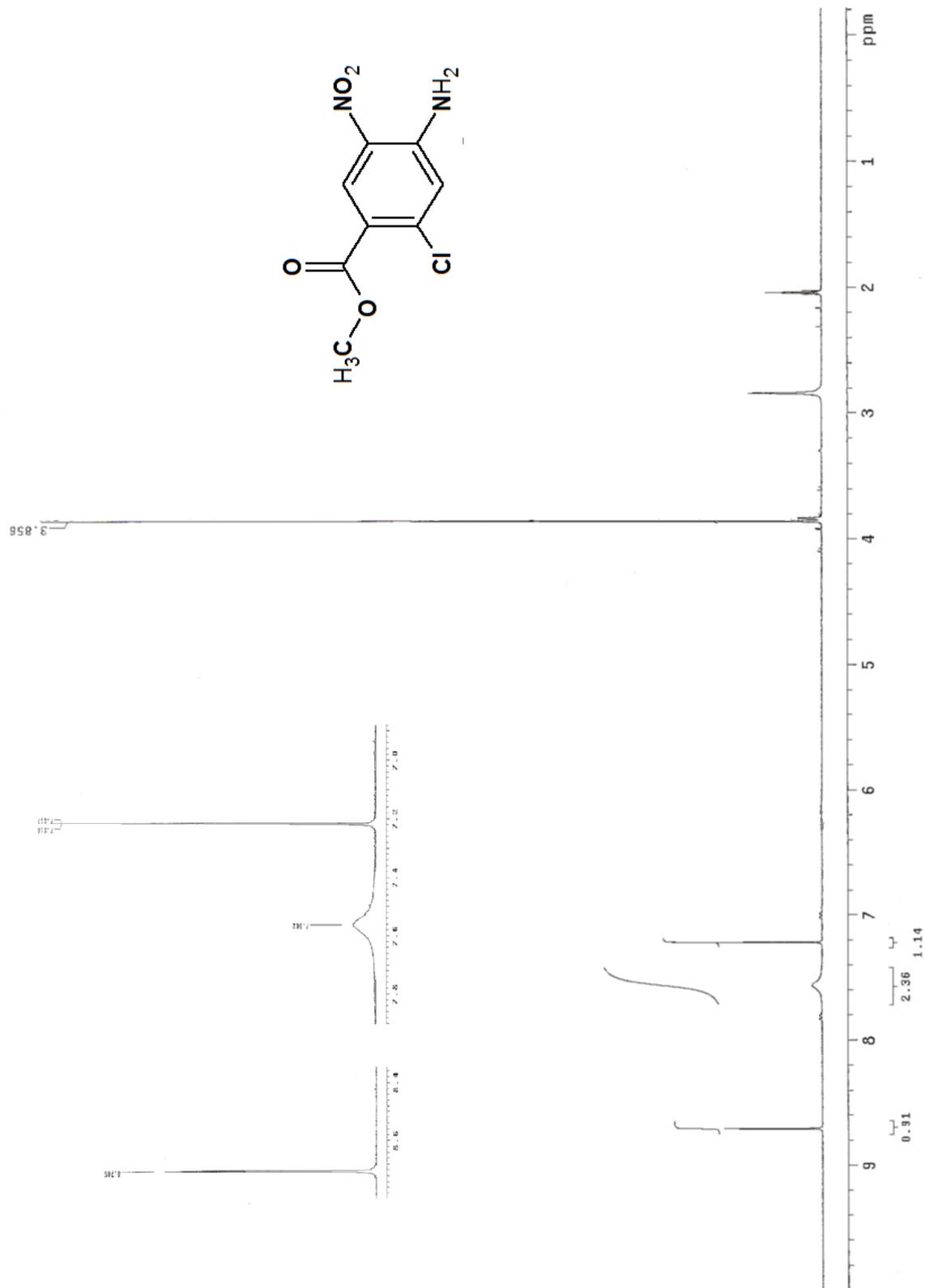
Espectro 10, IR: Pastilla (KBr) cm⁻¹: 4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5).



Espectro 11, RMN^1H . (TMS, CDCl_3) ppm: 4-Acetamido-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (5).



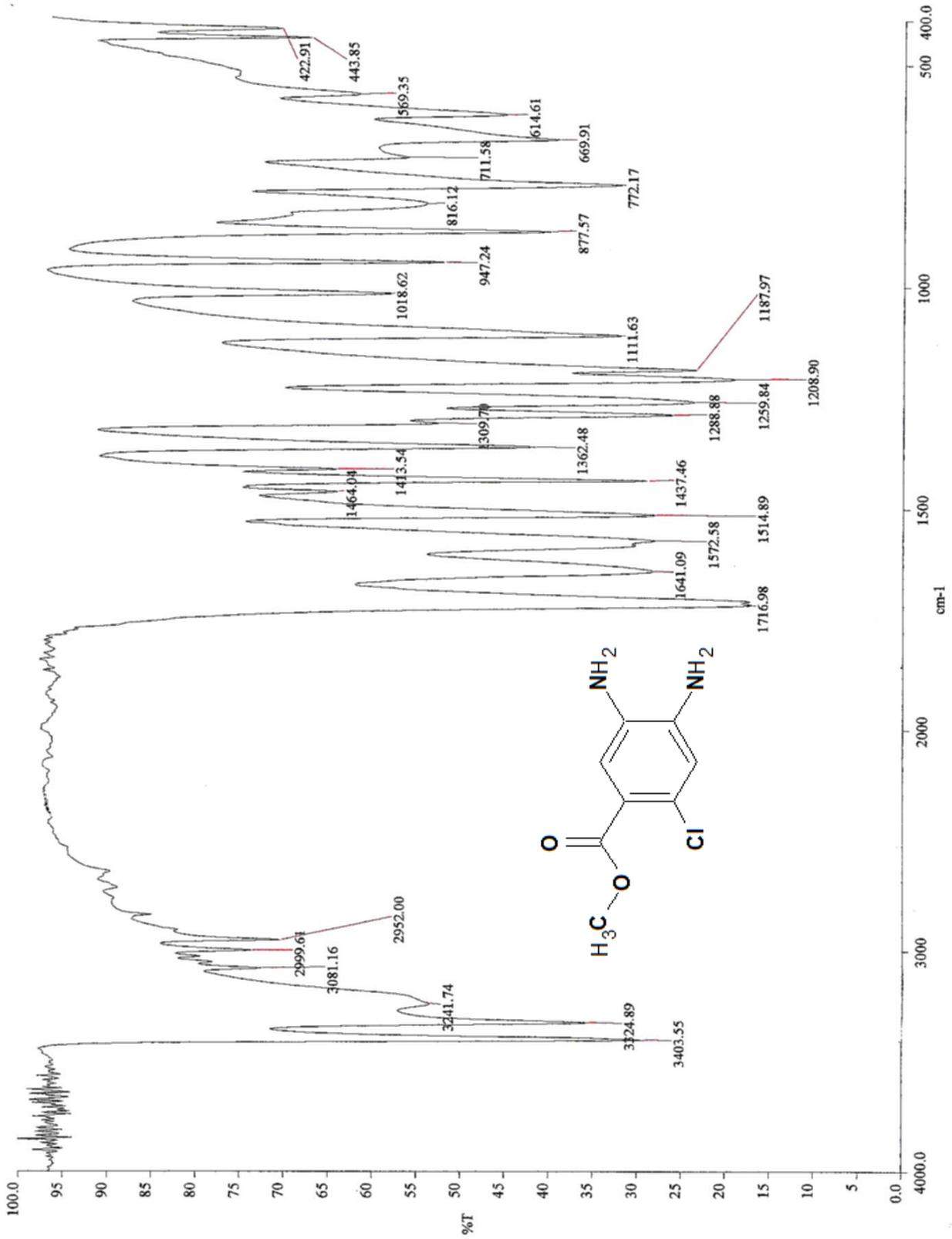
Espectro 13, IR: Pastilla (KBr) cm⁻¹: 4-Amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6).



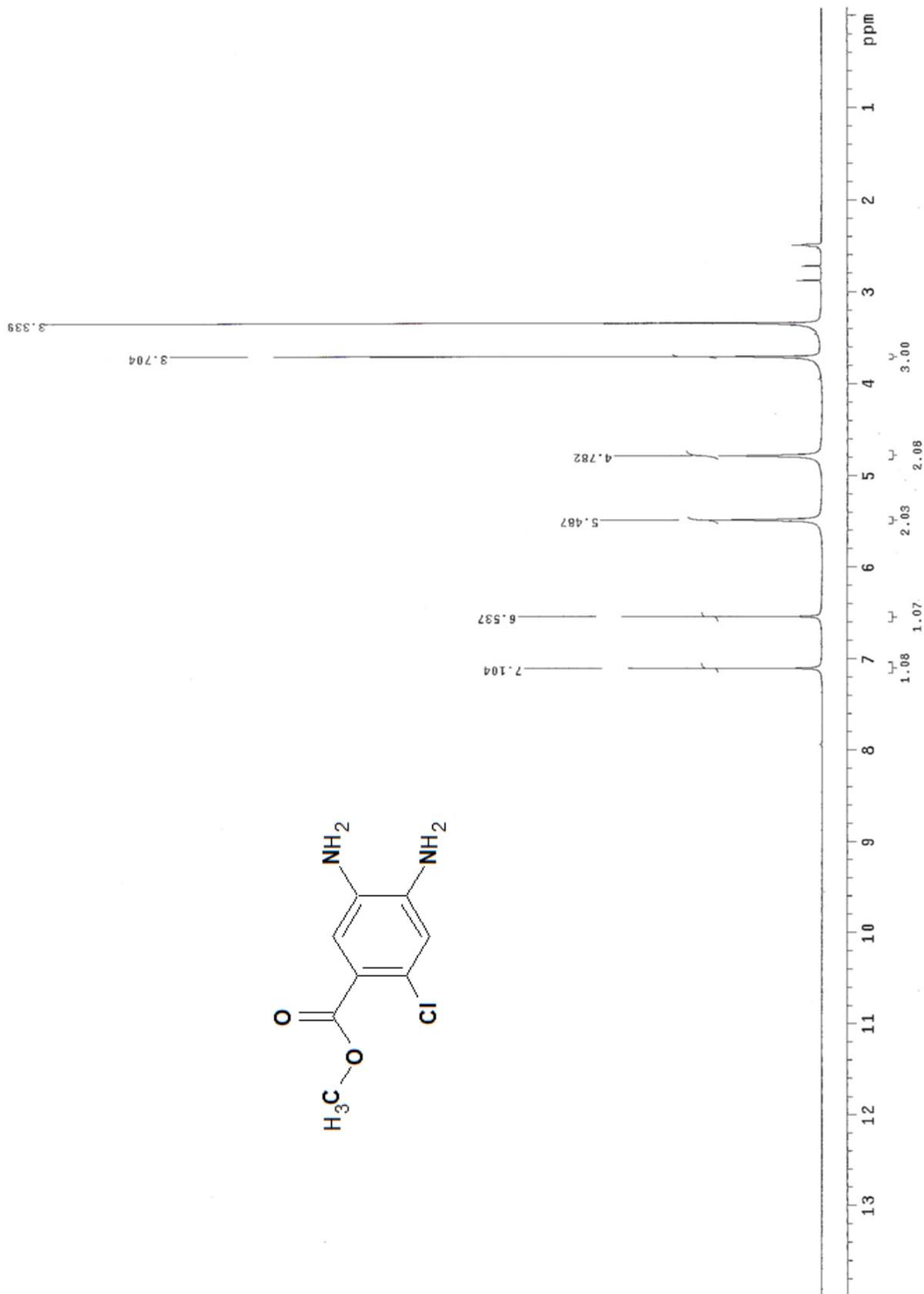
Espectro 14, RMN¹H. (TMS, acetona-d₆) ppm: 4-Amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo(6).



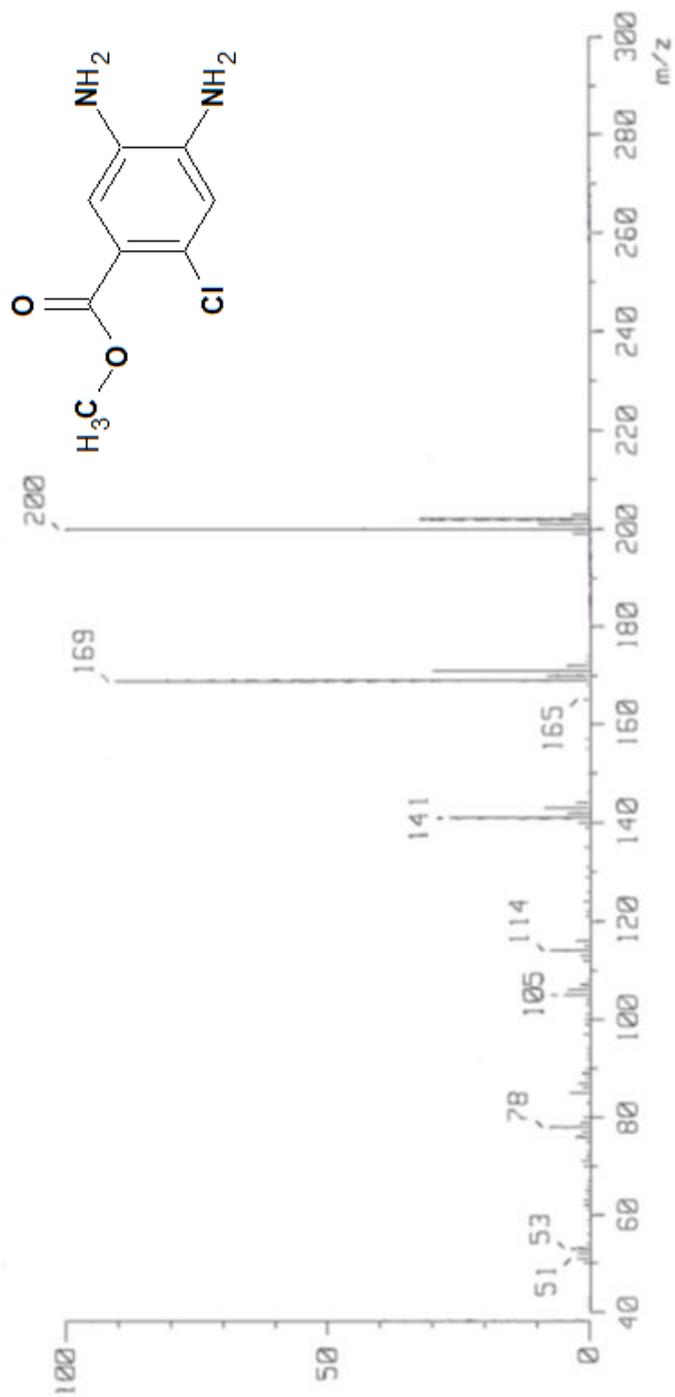
Espectro 15, EM. (IE/ID) m/z: 4-Amino-2-cloro-5-nitrobenzoato de metilo (6).



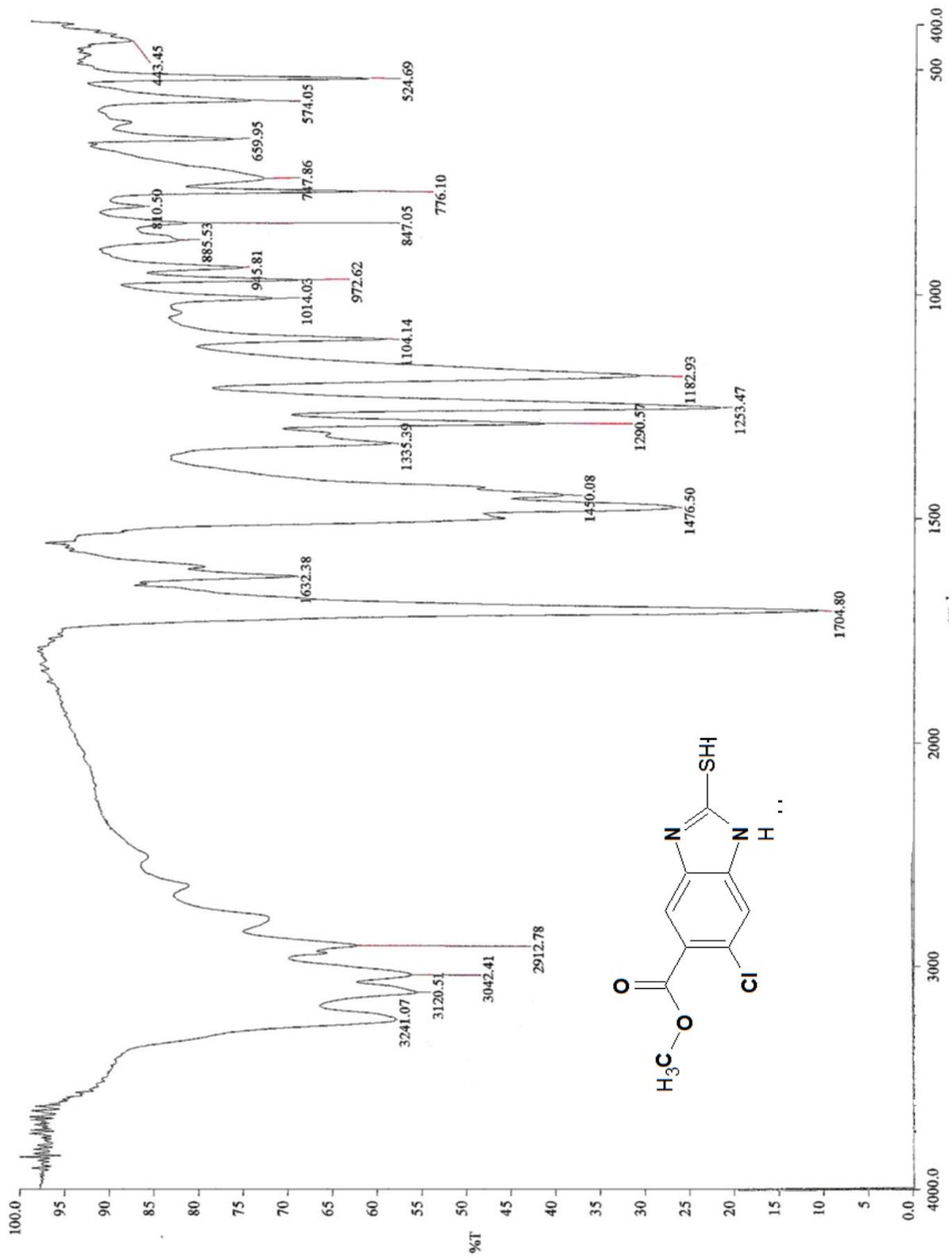
Espectro 16, IR: Pastilla (KBr) cm^{-1} : 4,5-Diamina-2-clorobenzoato de metilo (7).



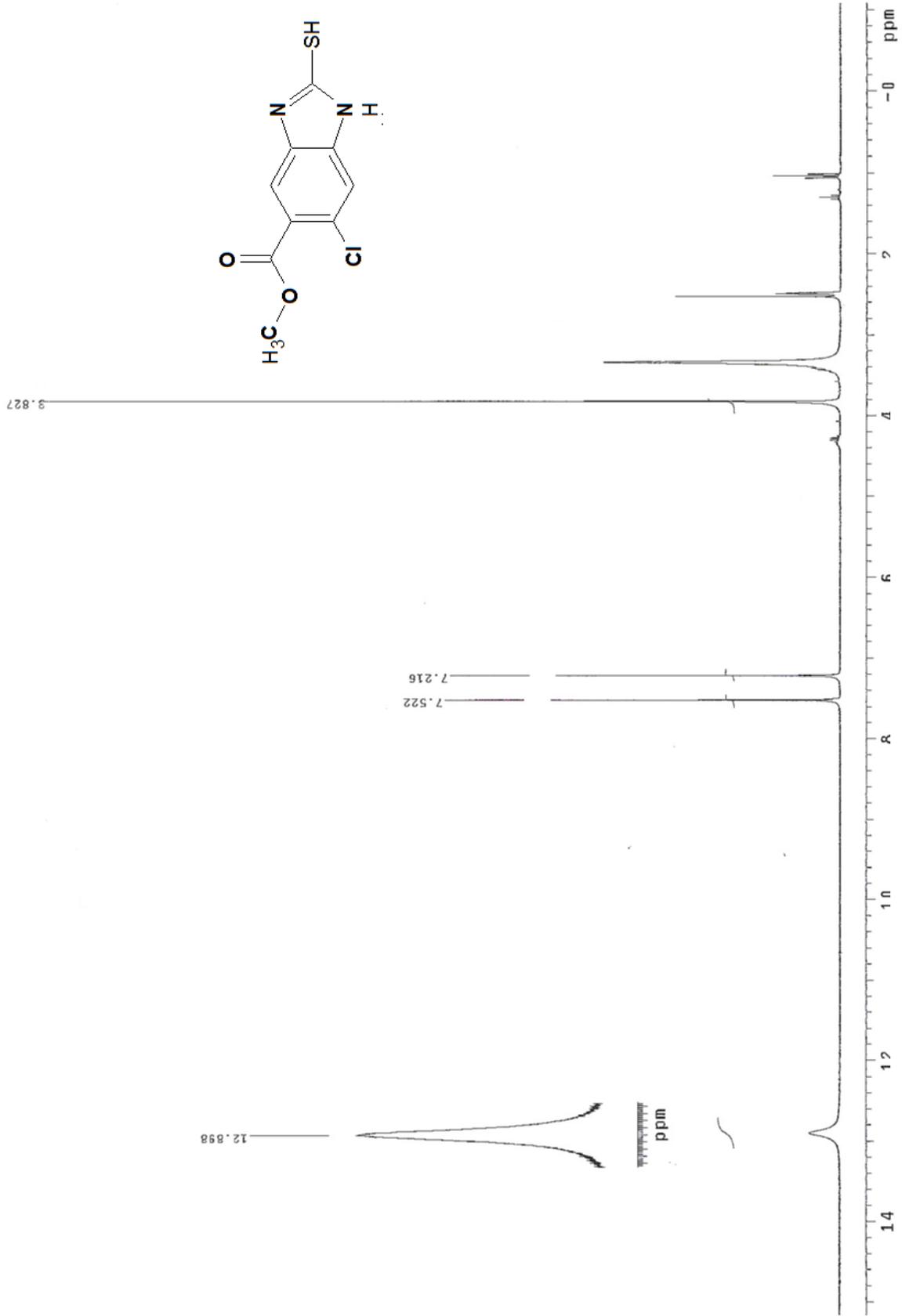
Espectro 17, RMN¹H. (TMS, DMSO-*d*₆) ppm: 4,5-Diamina-2-clorobenzoato de metilo (7).



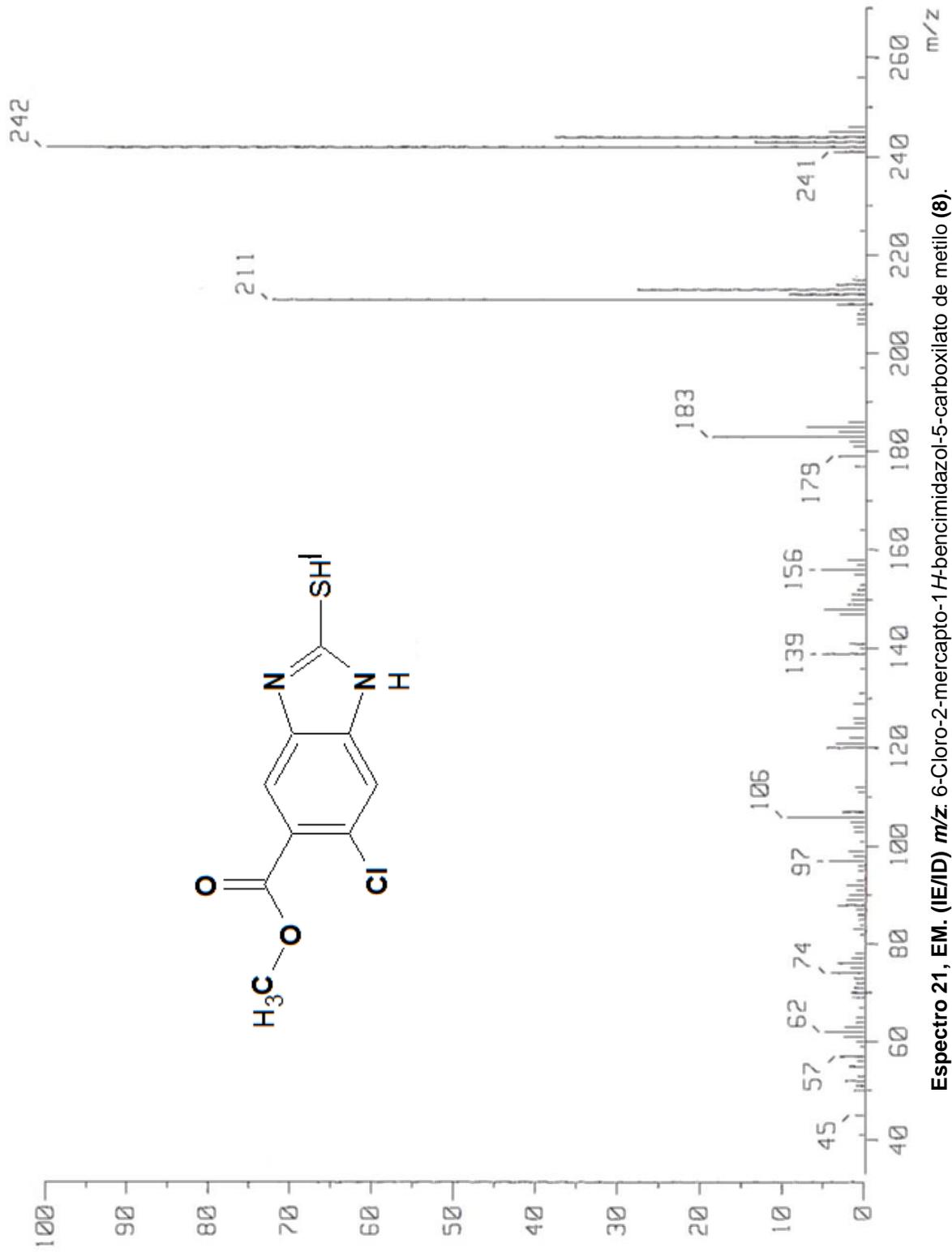
Espectro 18, EM. (IE/CG) m/z. 4,5-Diamina-2-clorobenzoato de metilo (7).

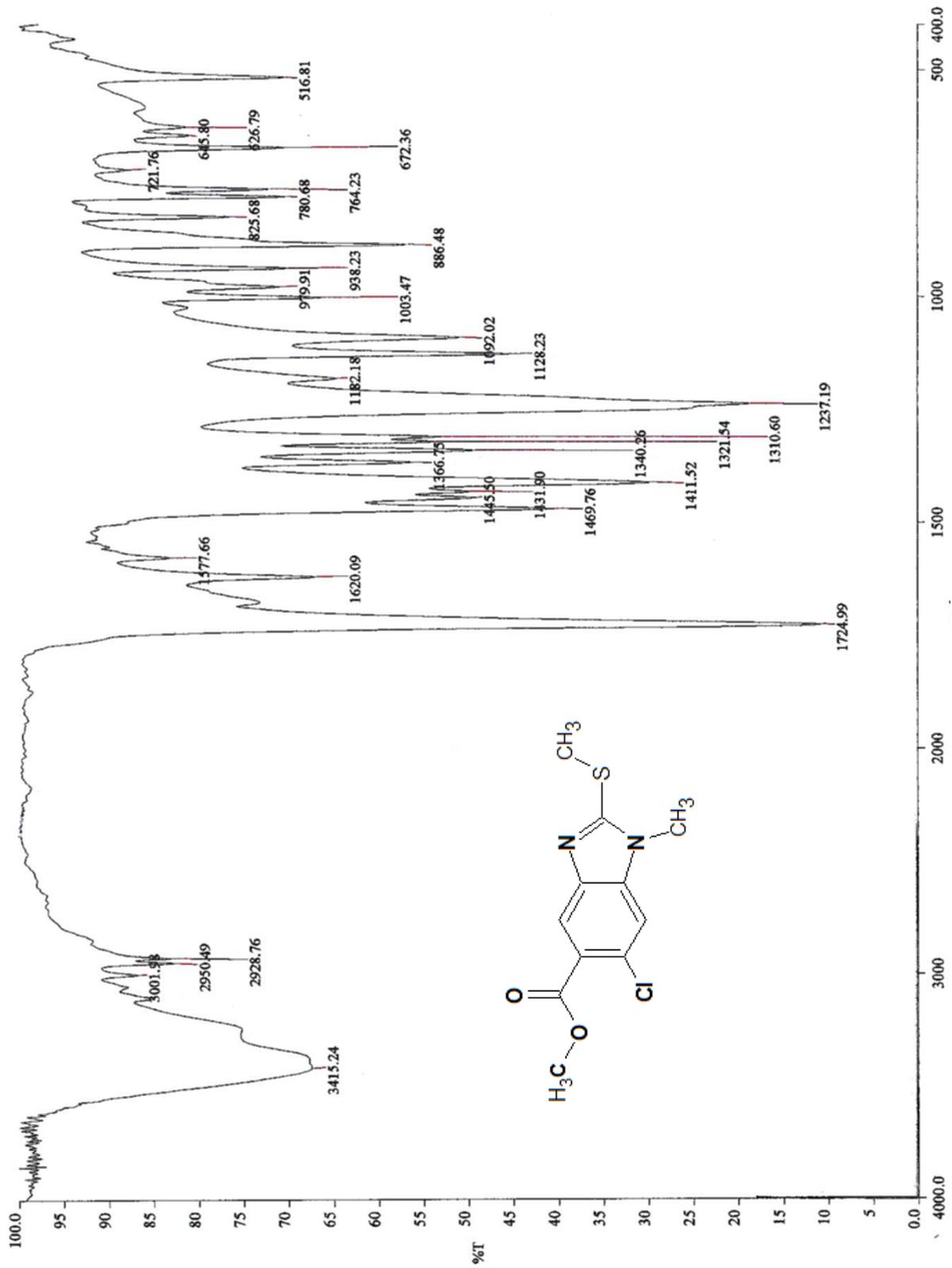


Espectro 19, IR: Pastilla (KBr) cm^{-1} : 6-Cloro-2-mercapto-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (8).

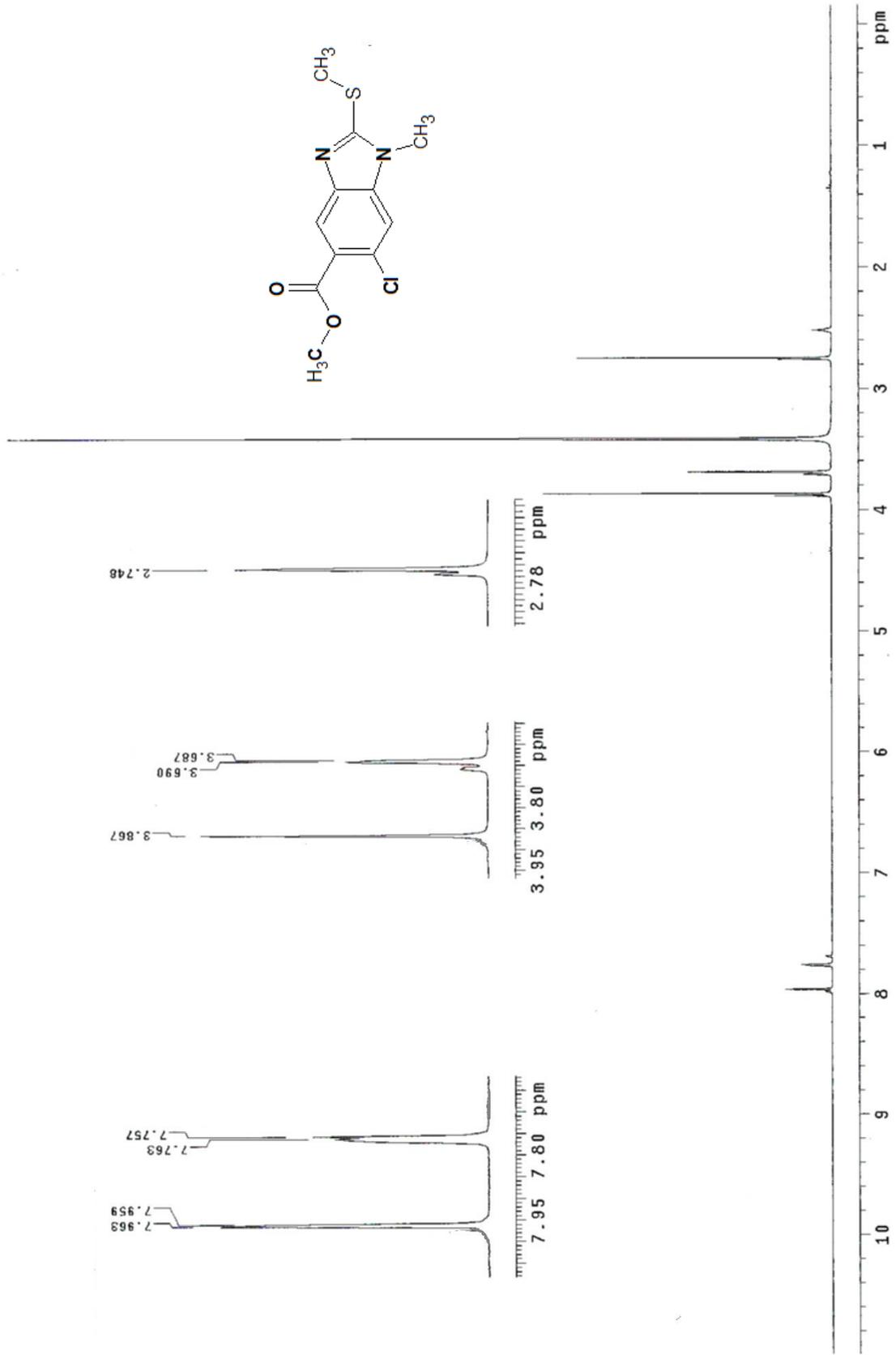


Espectro 20, RMN¹H. (TMS, DMSO-d₆) ppm: 6-Cloro-2-mercapto-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (8).

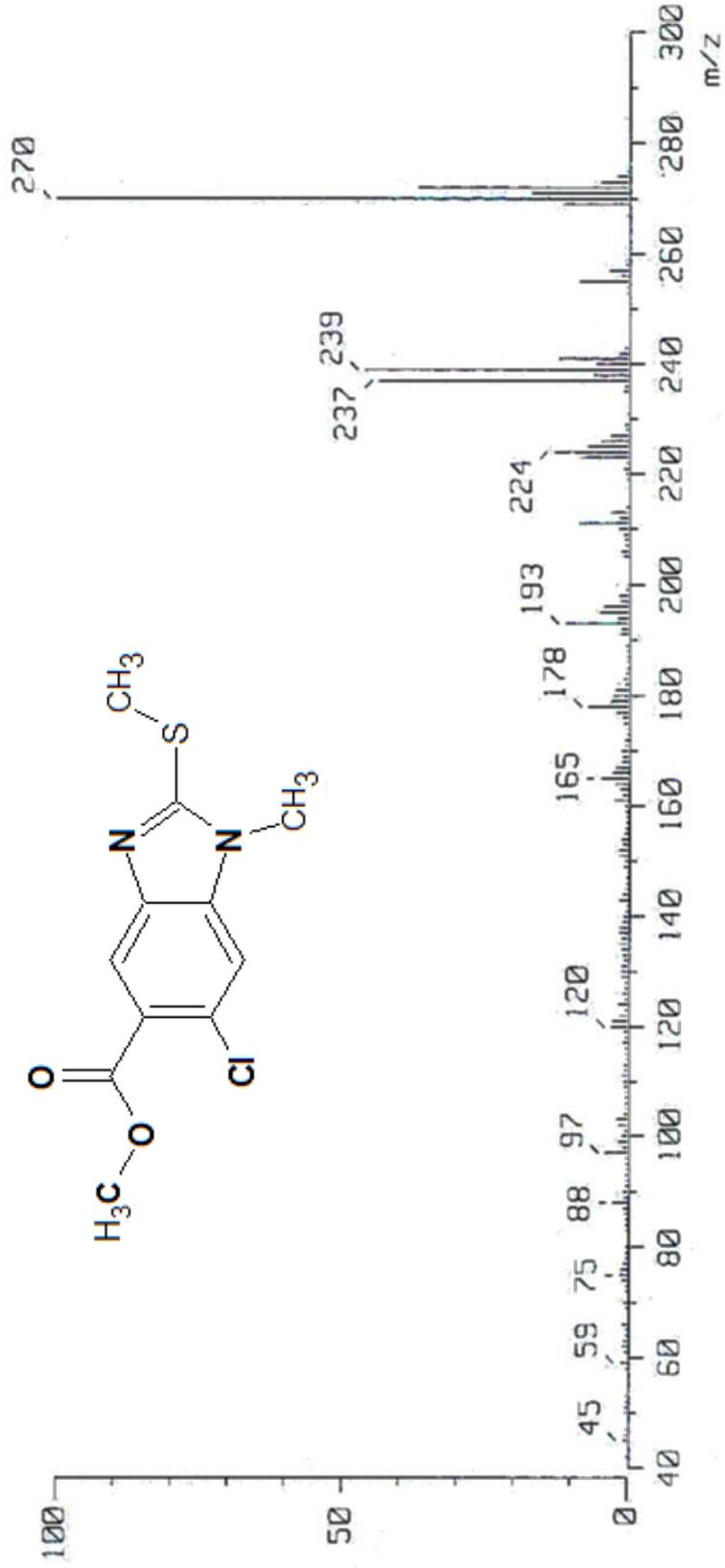




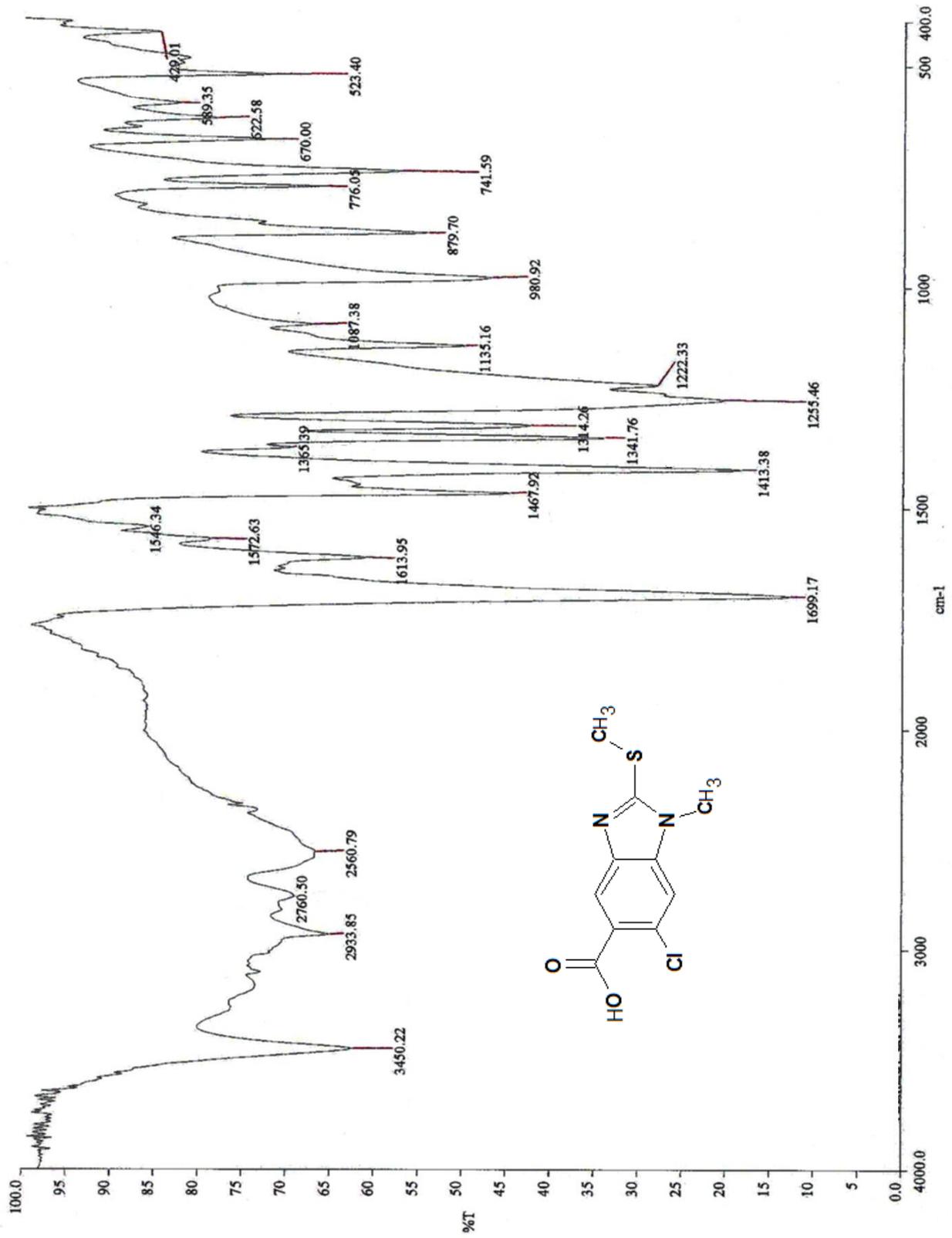
Espectro 22, IR: Pastilla (KBr) cm⁻¹: 6-Cloro-1-metil-2-(metilto)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (10).



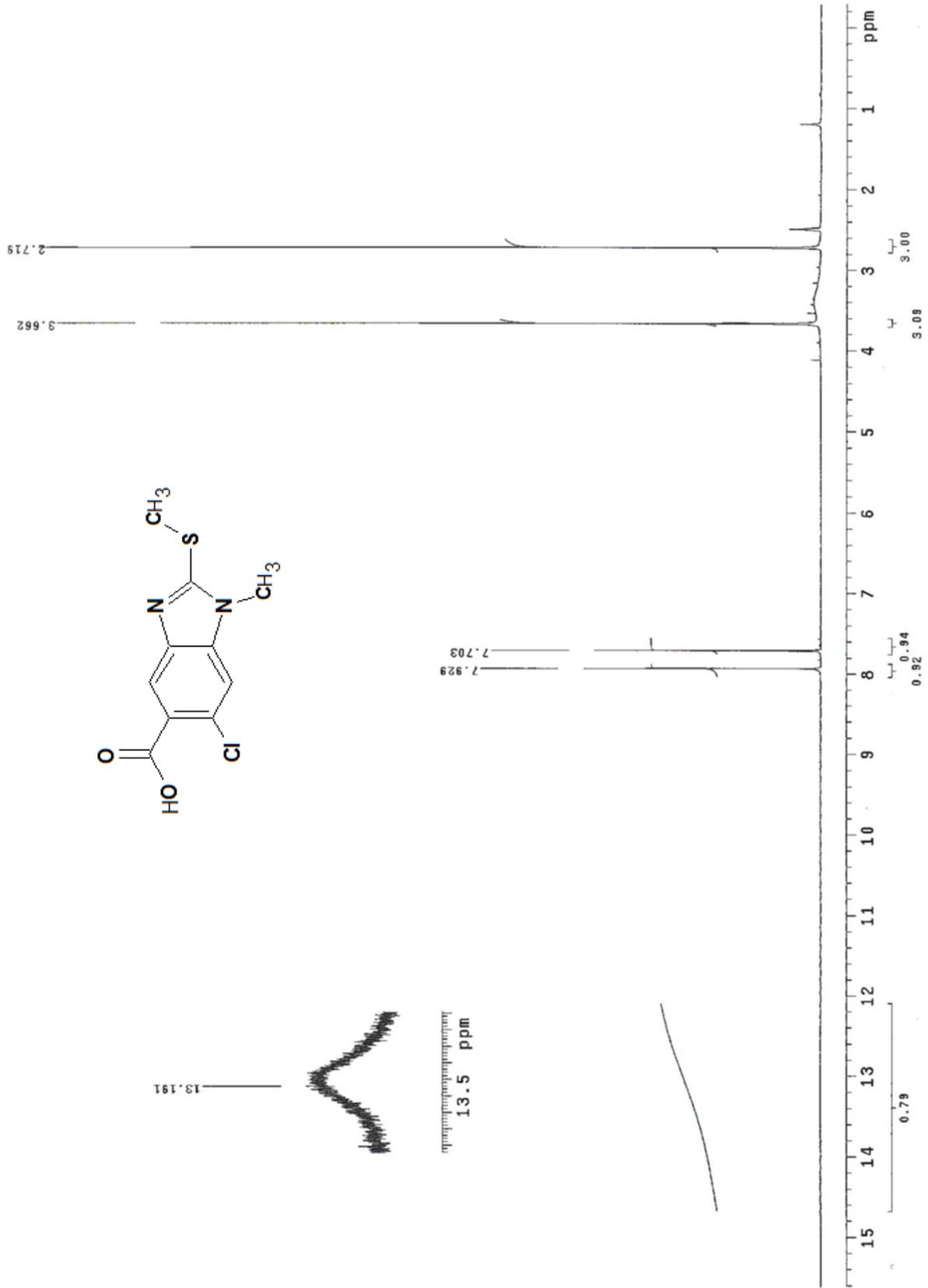
Espectro 23, RMN¹H. (TMS, CDCl₃) ppm: 6-Cloro-1-metil-2-(metilitio)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de metilo (10).



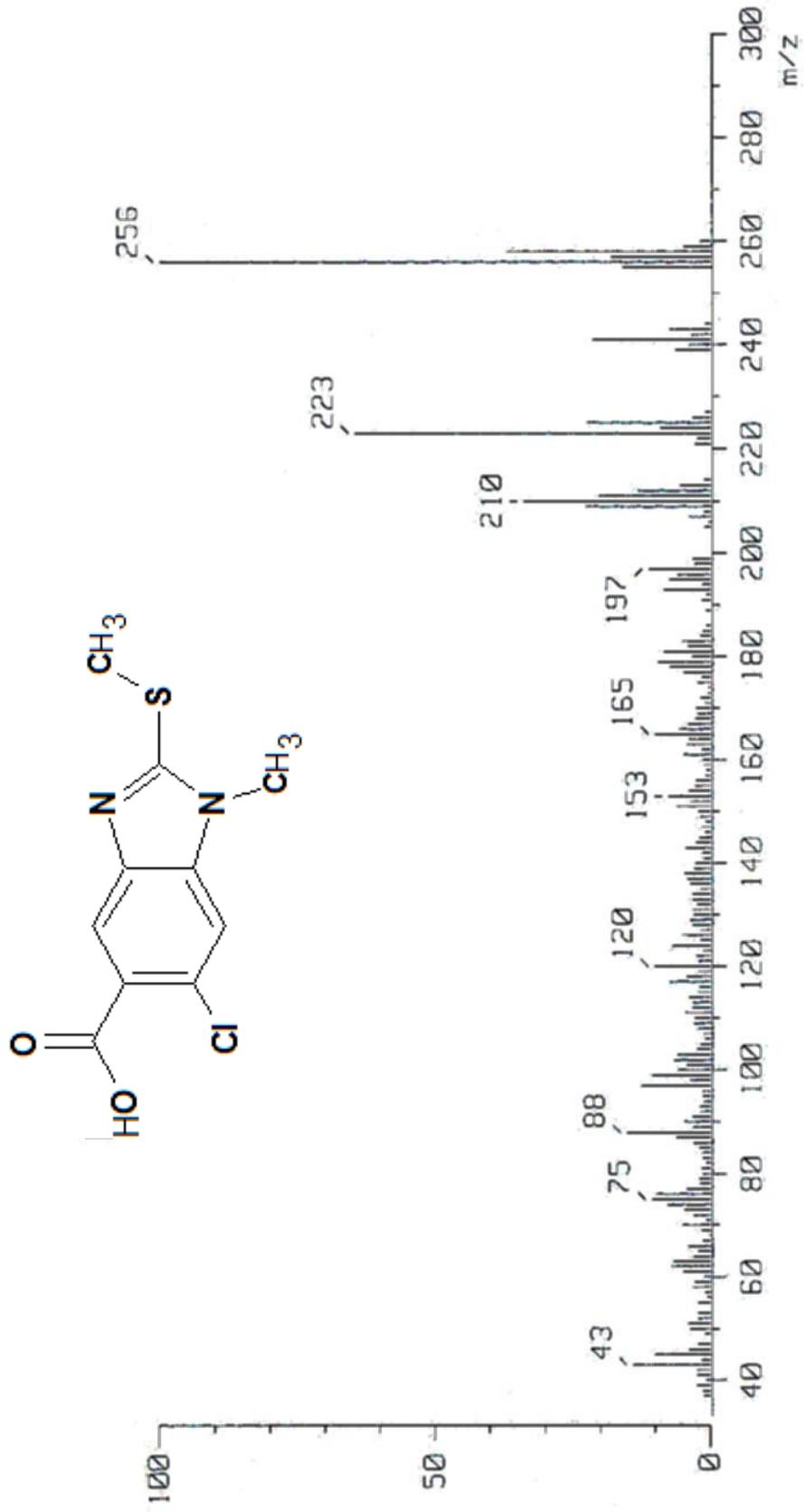
Espectro 24, EM. (IE/ID) m/z: 6-Cloro-1-metil-2-(metilthio)-1H-benzimidazol-5-carboxilato de metilo (10).



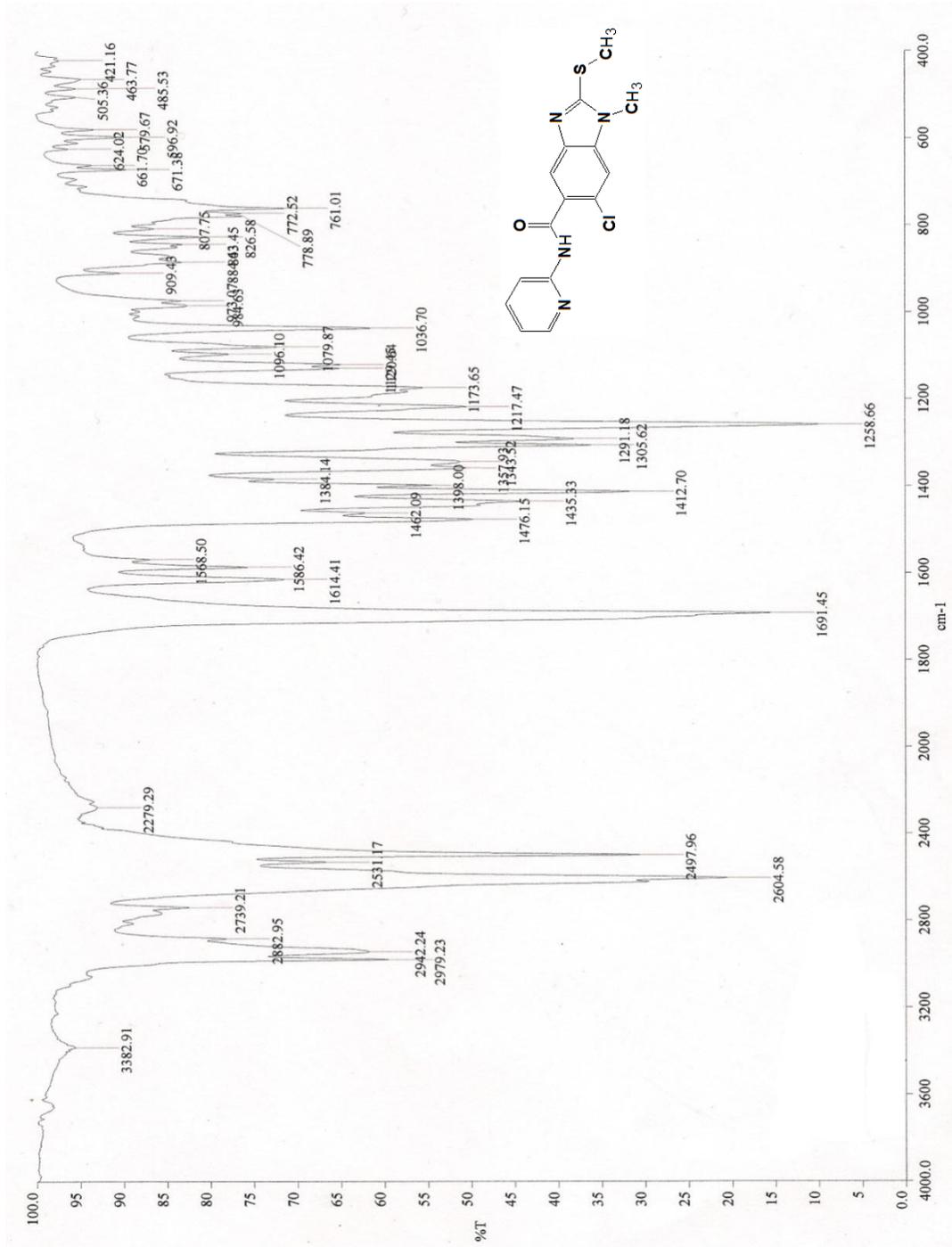
Espectro 25, IR: Pastilla (KBr) cm⁻¹: Ácido 6-cloro-1-metil-2-metil-5H-benzimidazol-5-carboxílico (11).



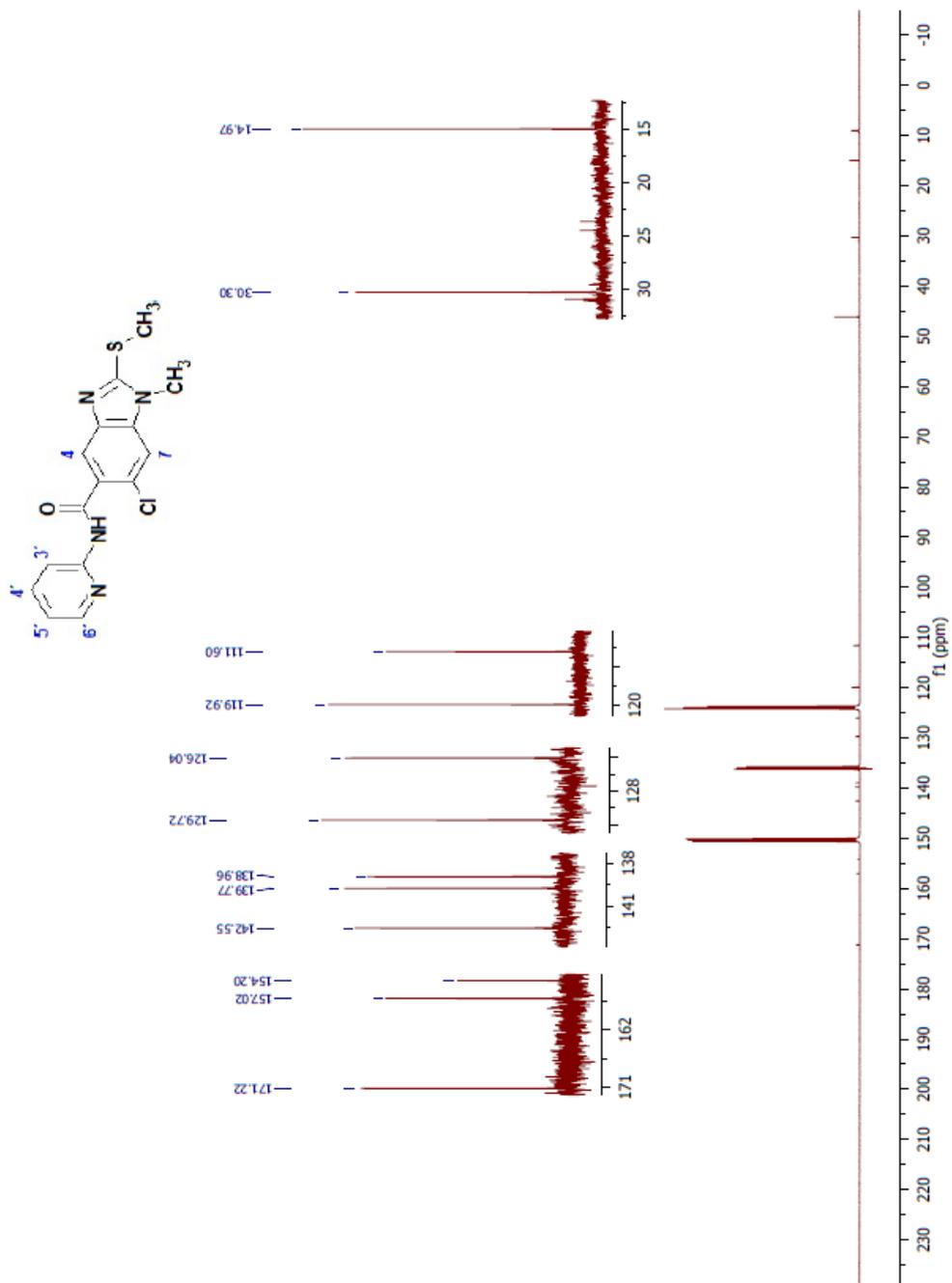
Espectro 26, RMN¹H. (TMS, DMSO-*d*₆) ppm: Ácido 6-cloro-1-metil-2-metilio-1H-benzimidazol-5-carboxílico (11).



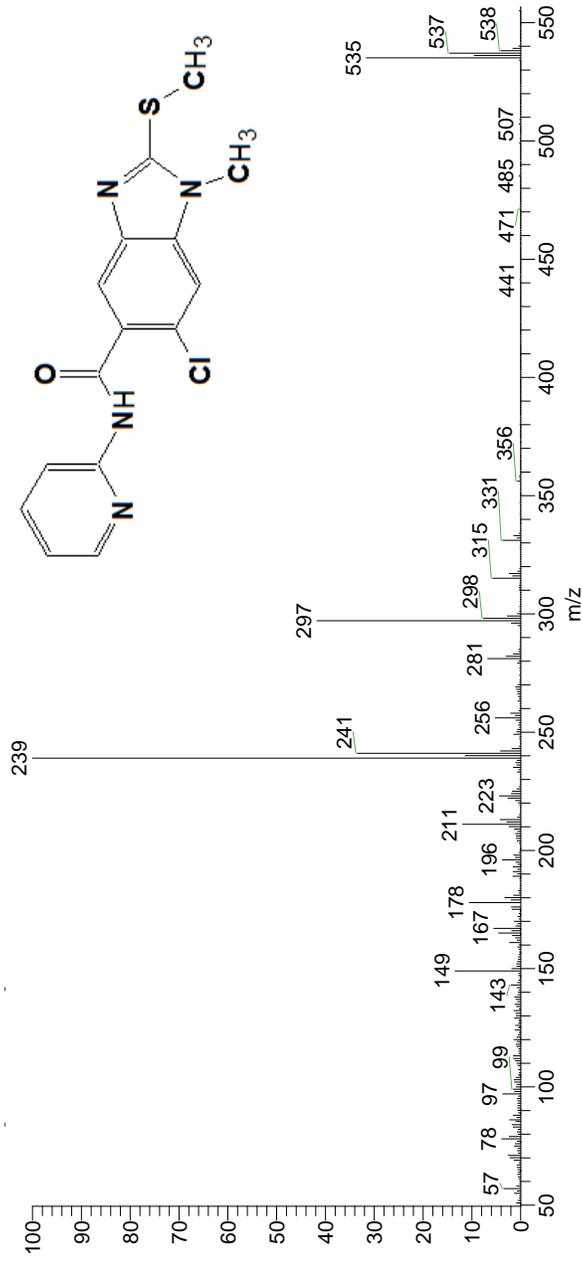
Espectro 27, EM. (IE/ID) *m/z*: Ácido 6-cloro-1-metil-2-metil-1H-benzimidazol-5-carboxílico (11).



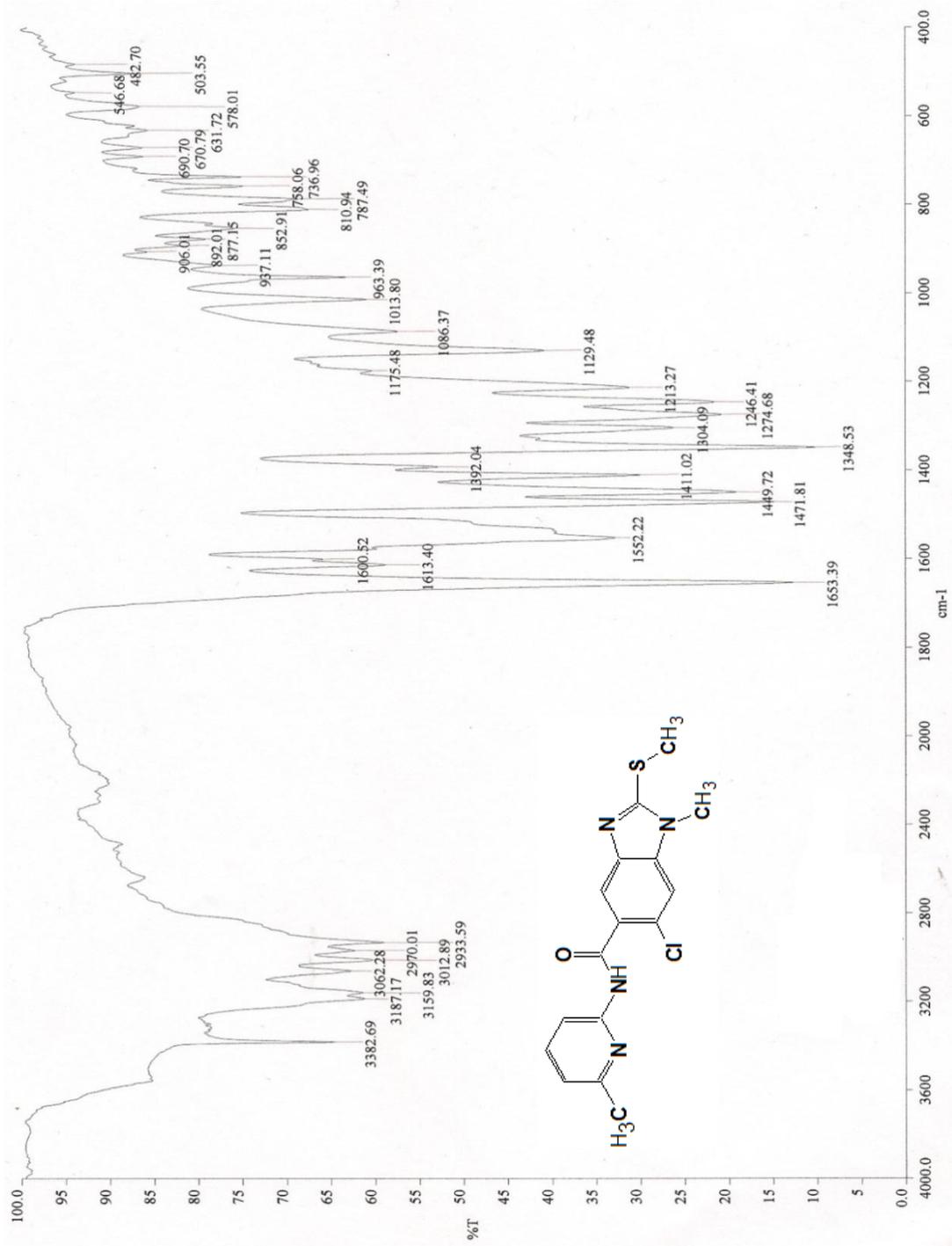
Espectro 28, IR: FTIR reflectancia cm⁻¹: 6-cloro-1-metil-2-(metilitio)-N-(piridina-2-il)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (PYP1).



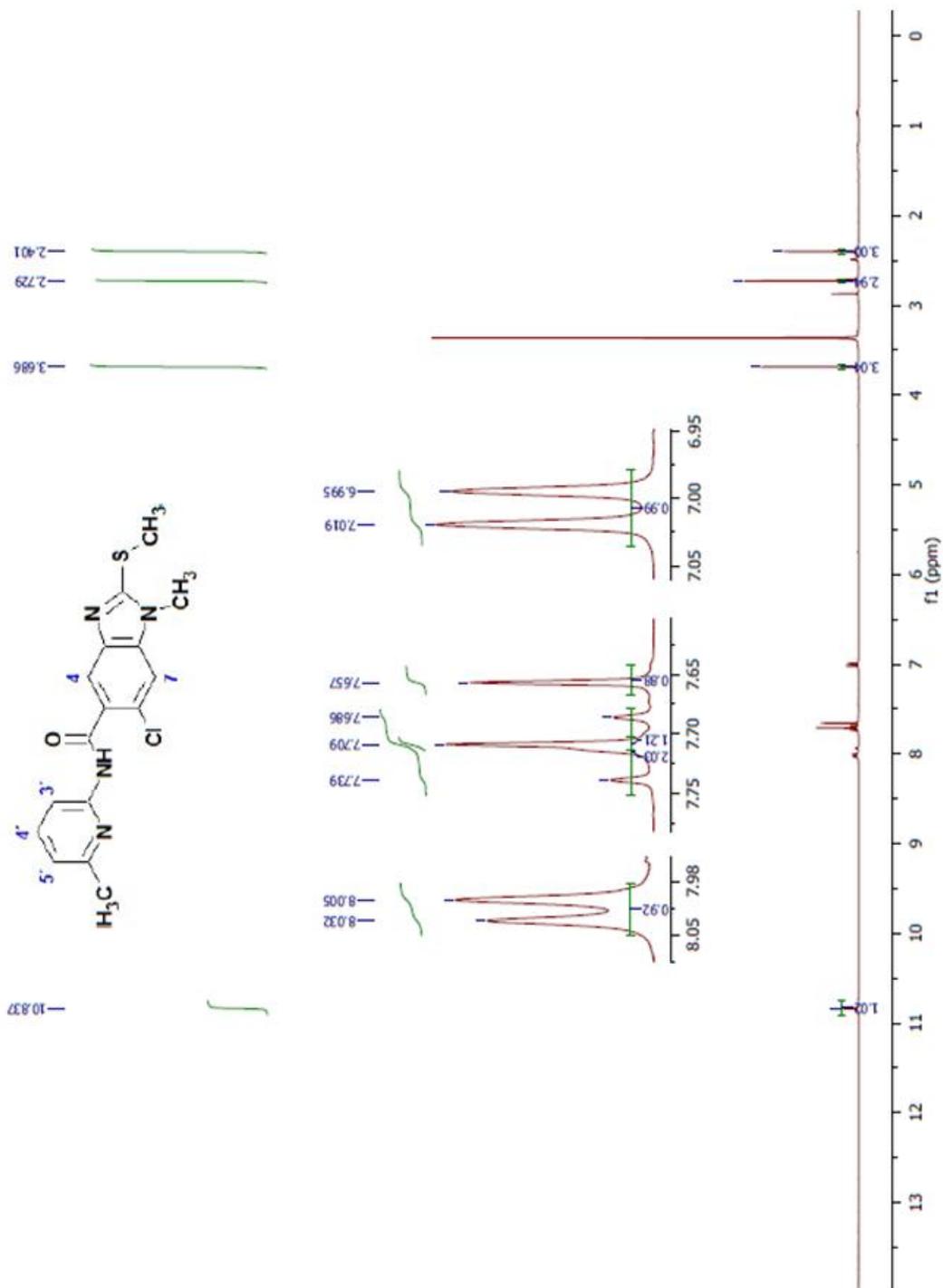
Espectro 30, RMN¹³C. (TMS, Piridina-d₅) ppm: 6-cloro-1-metil-2-(metil-tio)-*N*-(piridina-2-il)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (PYP1).



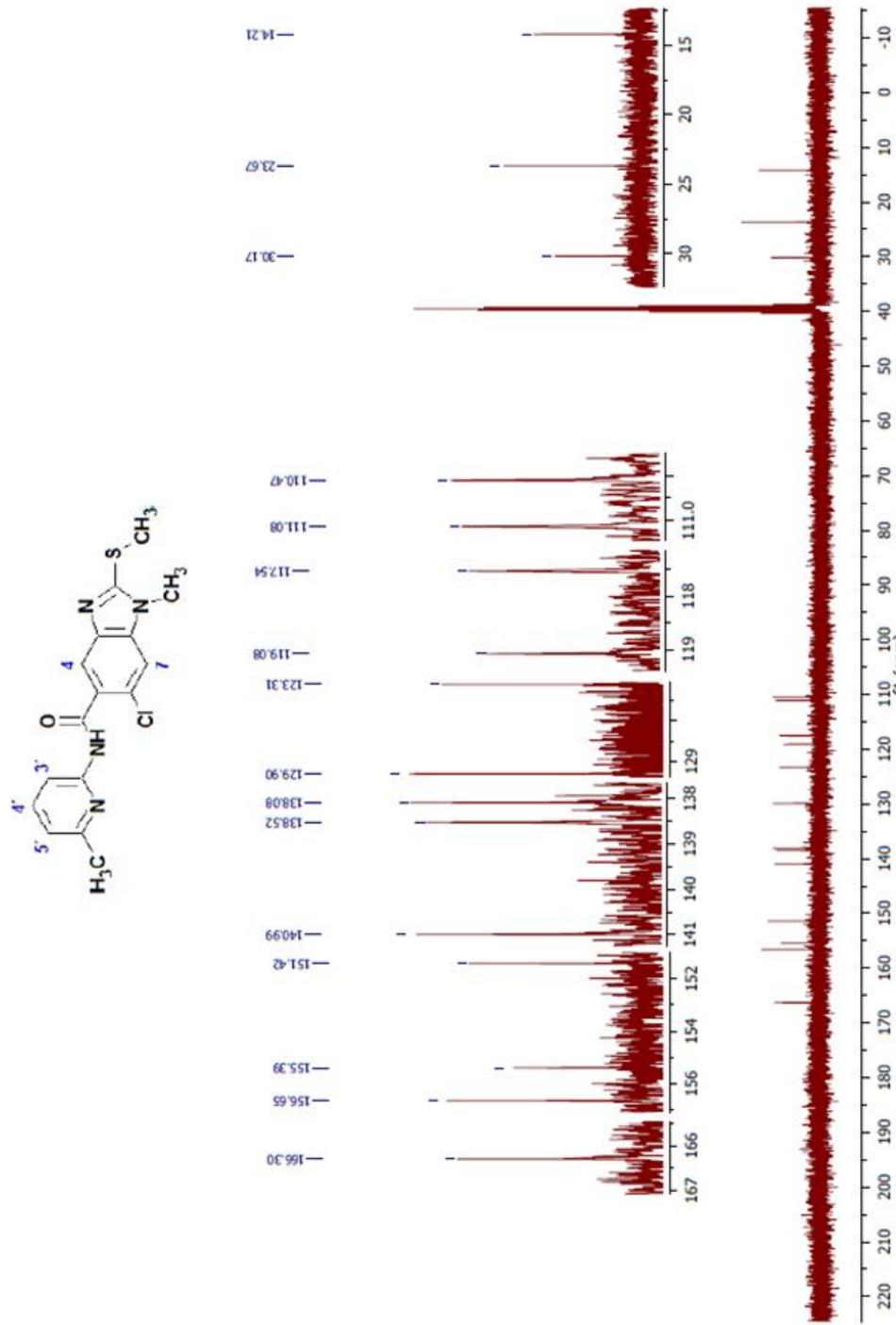
Espectro 31, EM. (IE/ID) m/z: 6-cloro-1-metil-2-(metil-2-(metil-2-(piridina-2-il)-1-H-bencimidazol-5-carboxamida (PYP1).



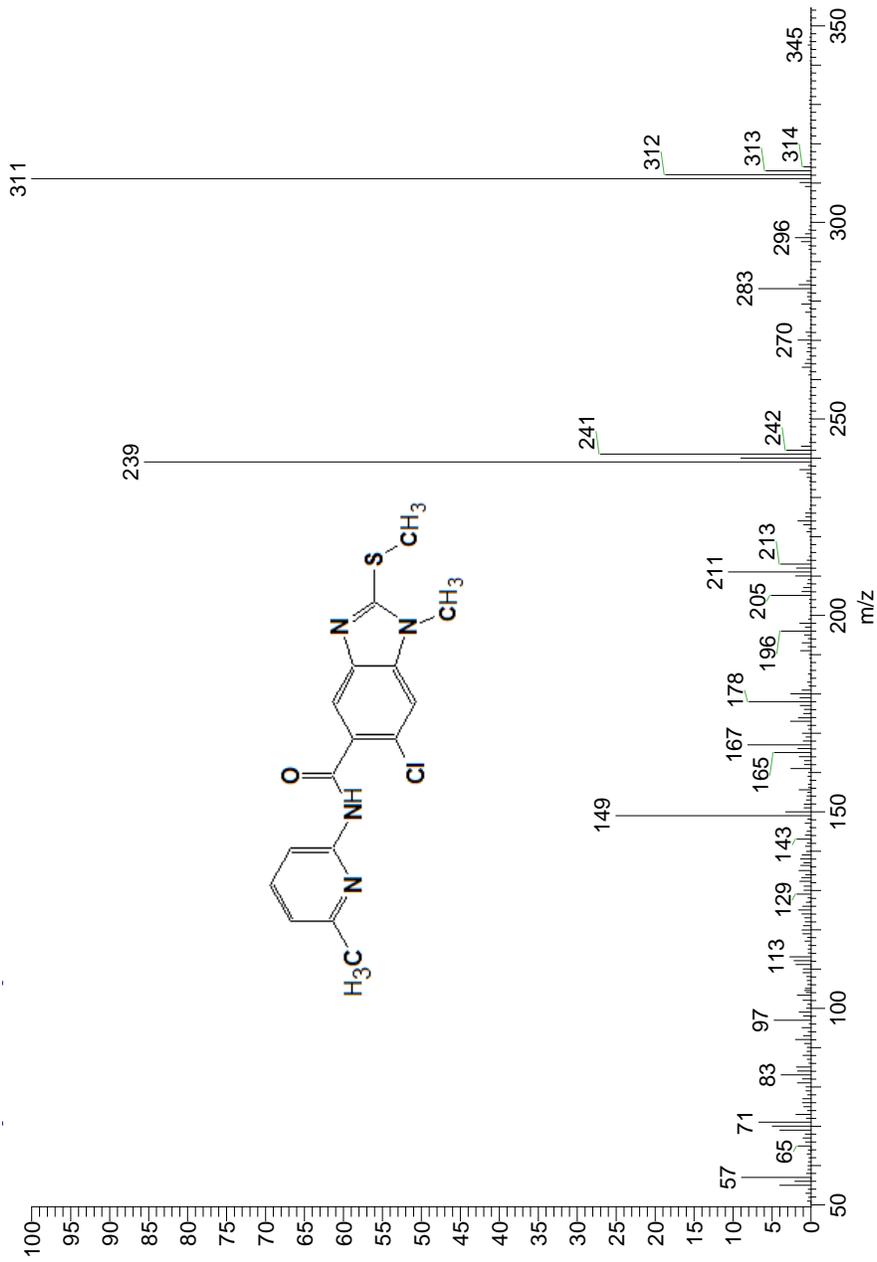
Espectro 32, IR: FTIR reflectancia cm^{-1} : 6-cloro-1-metil-N-(6-metilpiridin-2-il)-2-(metilitio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (PYP2).



Espectro 33, RMN¹H. (TMS, DMSO-d₆) ppm: 6-cloro-1-metil-N-(6-metilpiridin-2-il)-2-(metilito)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (PYP2).



Espectro 34, RMN¹³C. (TMS, DMSO-d₆, 300 MHz) ppm: 6-cloro-1-metil-N-(6-metilpiridin-2-il)-2-(metilitio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (PYP2).



Espectro 35, EM. (IE/ID) *m/z*: 6-cloro-1-metil-N-(6-metilpiridin-2-il)-2-(metilitio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (PYP2).

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

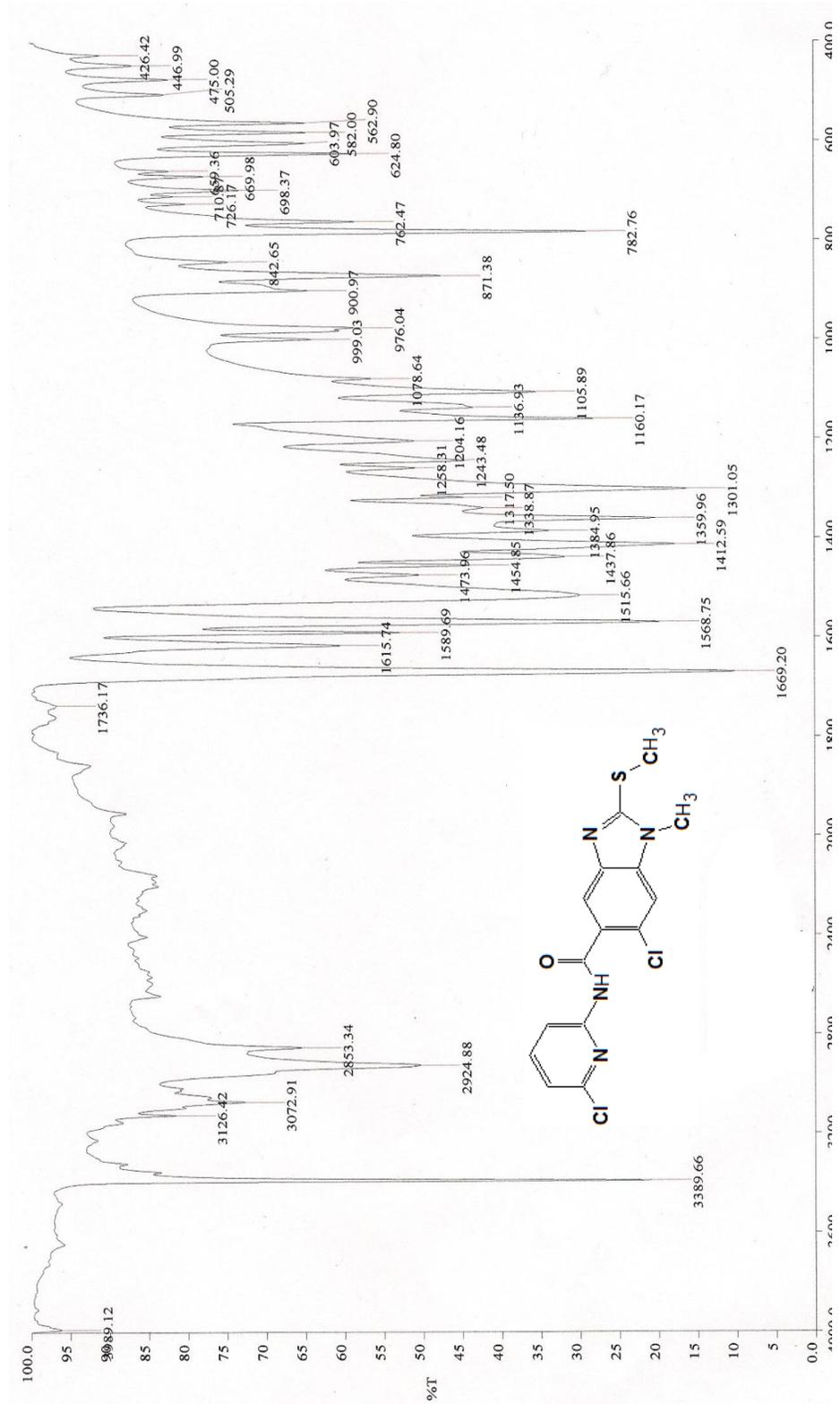
Tolerance = 100.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 32 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)
 Elements Used:

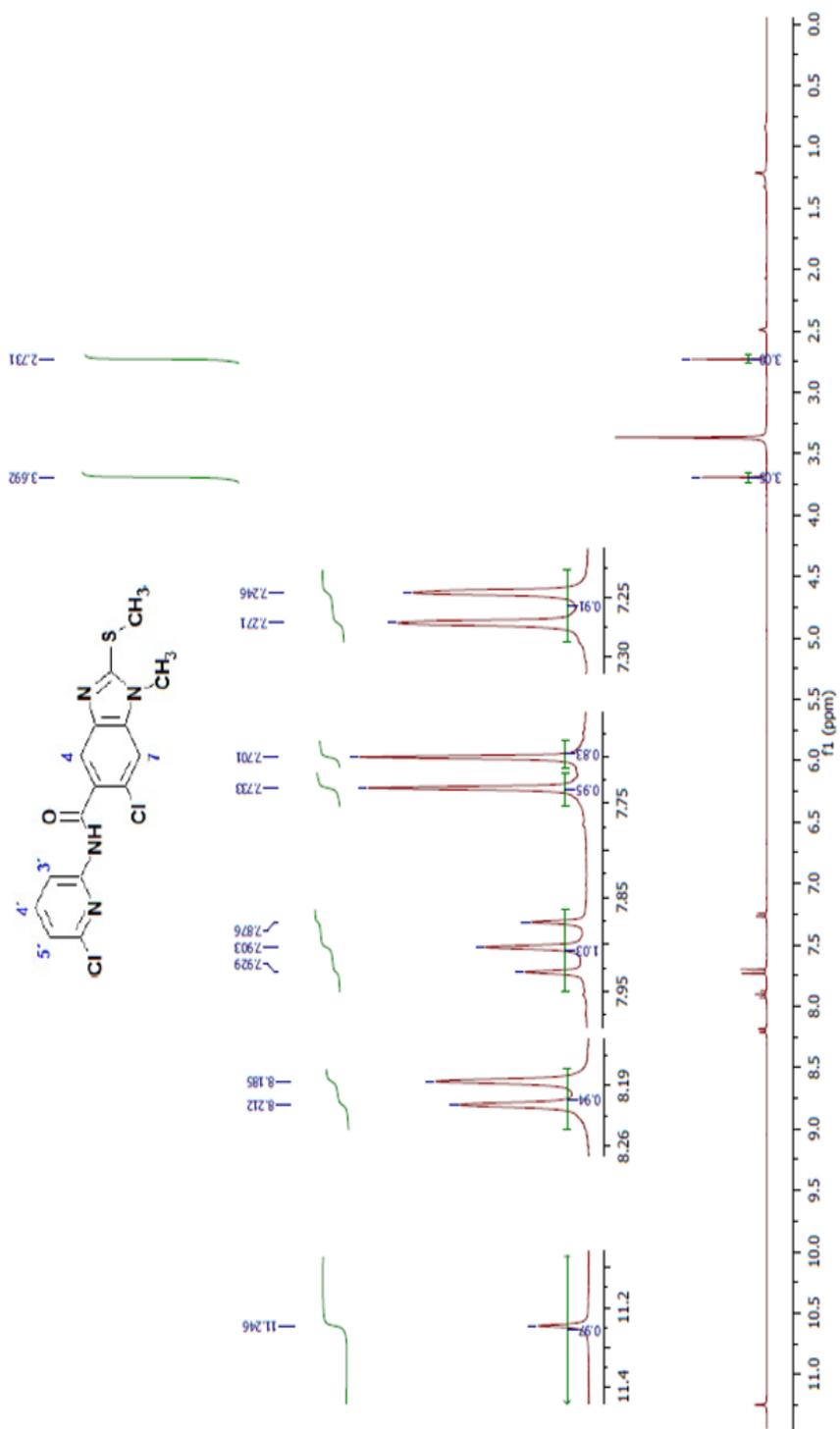
C: 15-20 H: 13-18 N: 3-5 O: 0-3 S: 1-1 Cl: 0-3

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
347.0741	347.0733	0.8	2.3	10.5	C16 H16 N4 O S Cl
	347.0967	-22.6	-65.1	14.5	C19 H15 N4 O S
Minimum:				-1.5	
Maximum:		30.0	100.0	50.0	

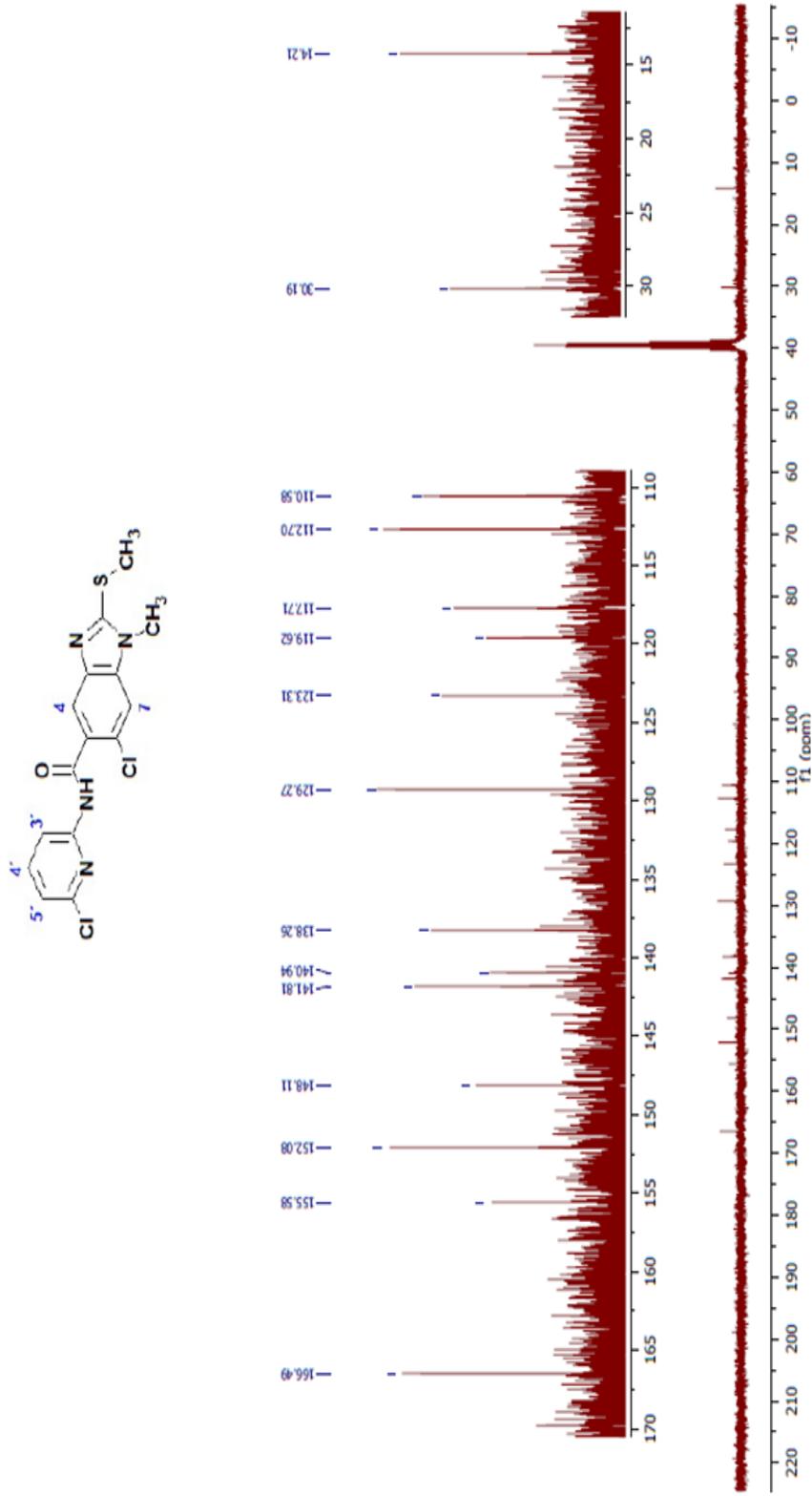
HRSM ESI: 6-cloro-1-metil-N-(6-metilpiridin-2-il)-2-(metilitio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (**PYP2**).



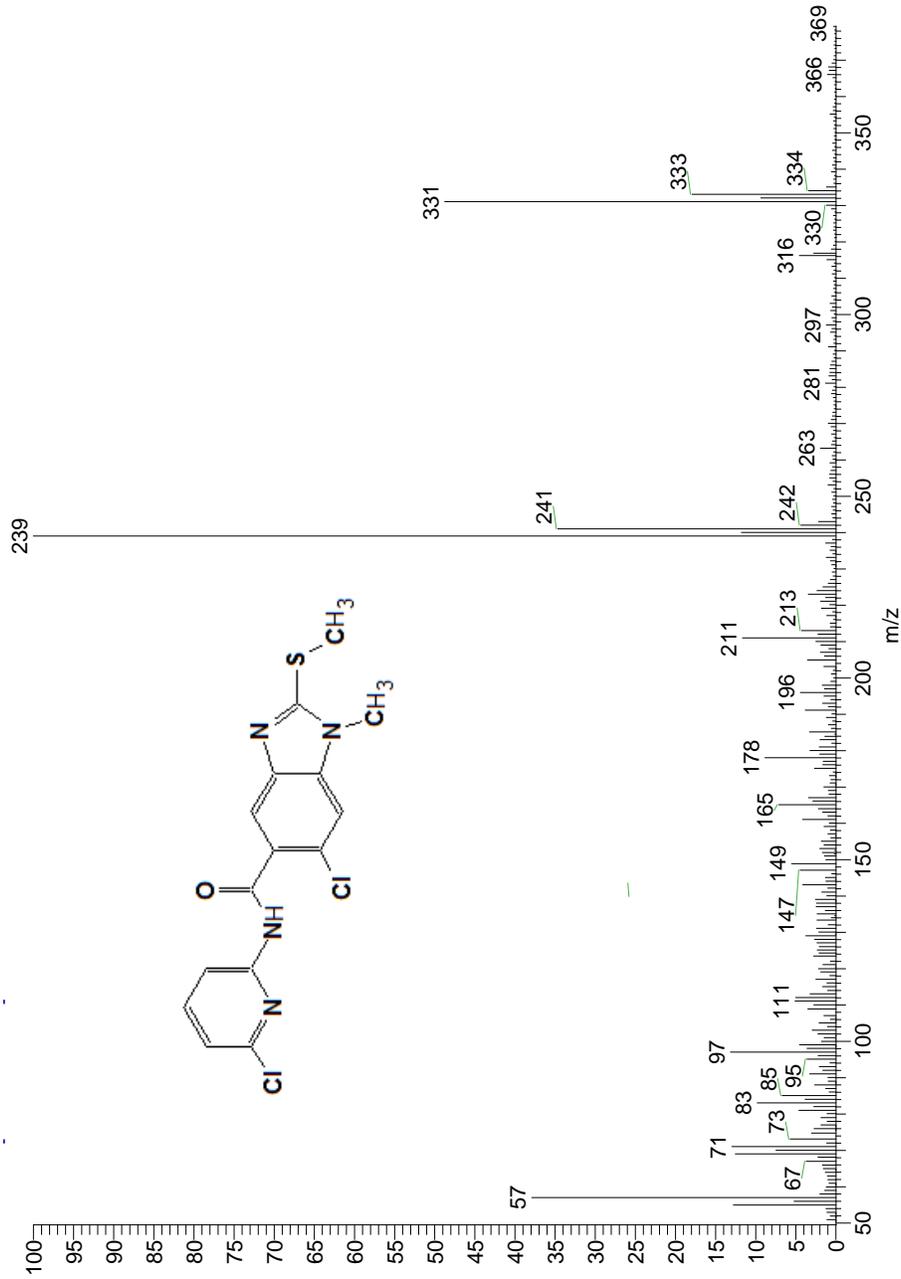
Espectro 36, IR: FTIR reflectancia cm^{-1} : 6-cloro-N-(6-cloroprídim-2-il)-1-metil-2-(metil)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (PYP3).



Espectro 37, RMN¹H. (TMS, DMSO-d₆) ppm: 6-cloro-N-(6-cloropridin-2-il)-1-metil-2-(metilitio)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (PYP3).



Espectro 38, RMN^{13}C . (TMS, $\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz) ppm: 6-cloro-*N*-(6-cloropridin-2-il)-1-metil-2-(metilitio)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (PYP3).



Espectro 39, EM. (IE/ID) *m/z*: 6-cloro-*N*-(6-cloropridin-2-il)-1-metil-2-(metilto)-1*H*-bencimidazol-5-carboxamida (PYP3).

Elemental Composition Report

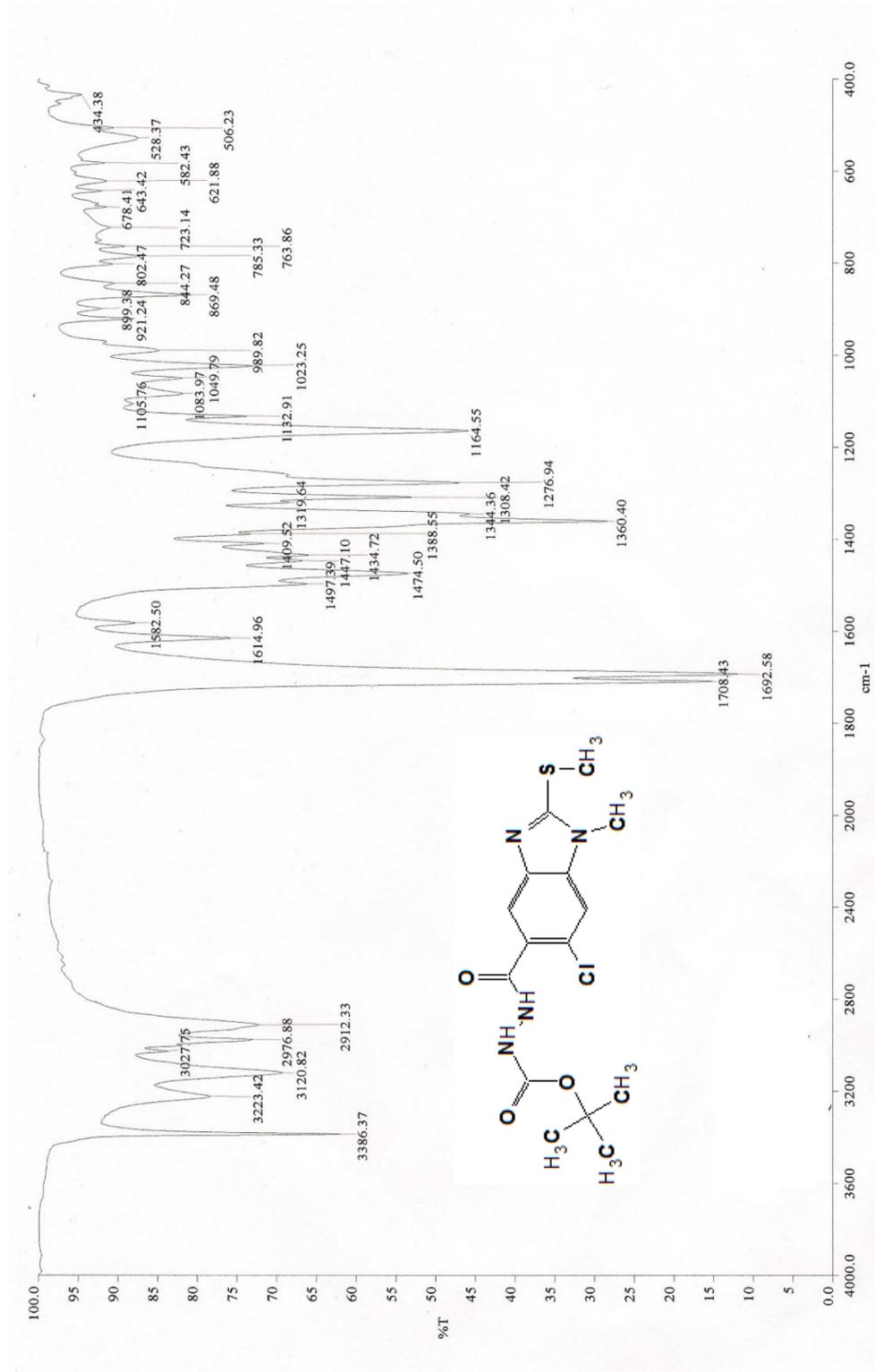
Single Mass Analysis

Tolerance = 100.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off

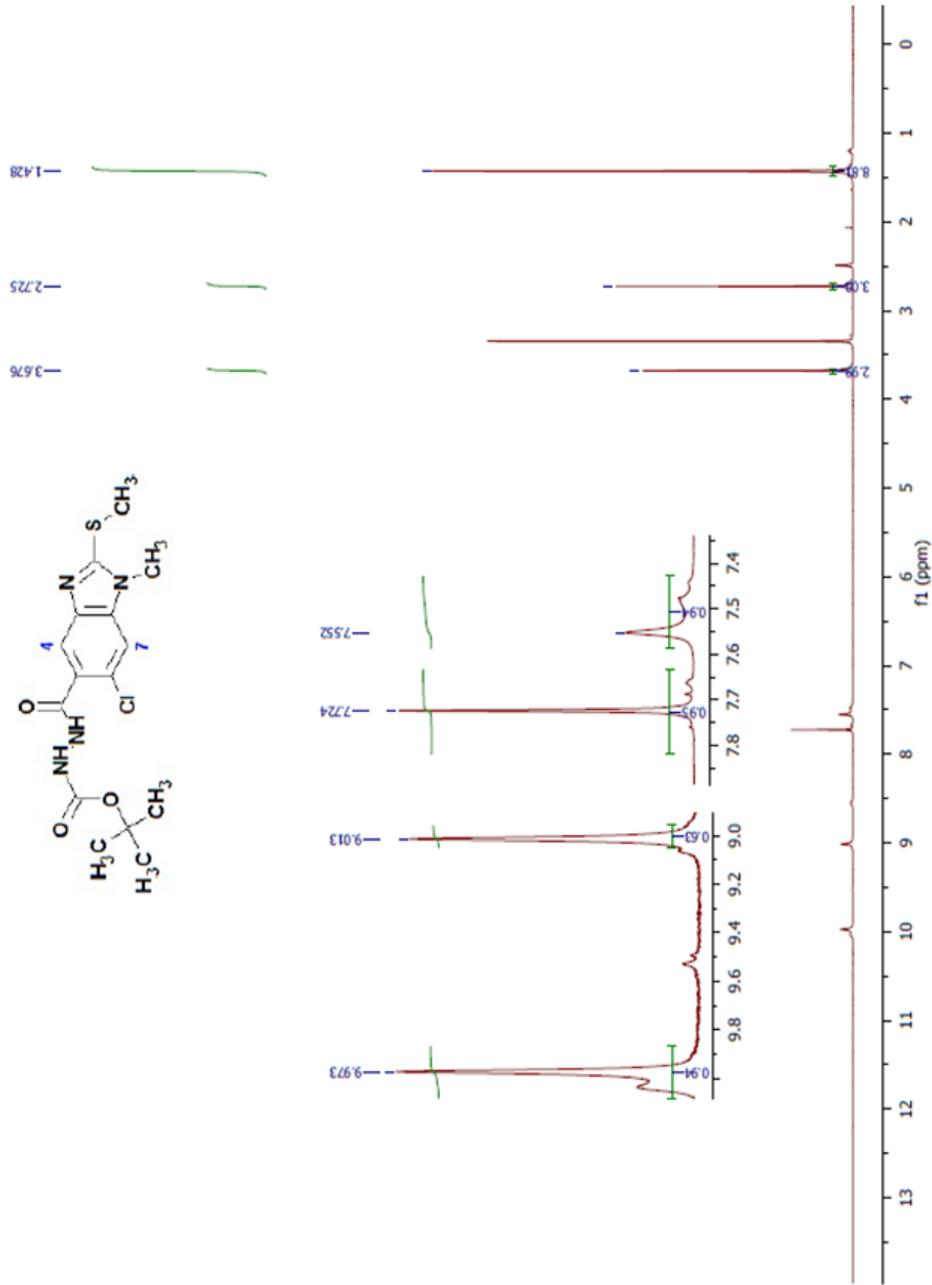
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 10 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)
 Elements Used:
 C: 13-16 H: 8-13 N: 3-5 O: 1-2 S: 1-1 Cl: 0-2

Minimum:						
Maximum:						
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	
367.0202	367.0187	1.5	4.1	10.5	C15 H13 N4 O S Cl2	

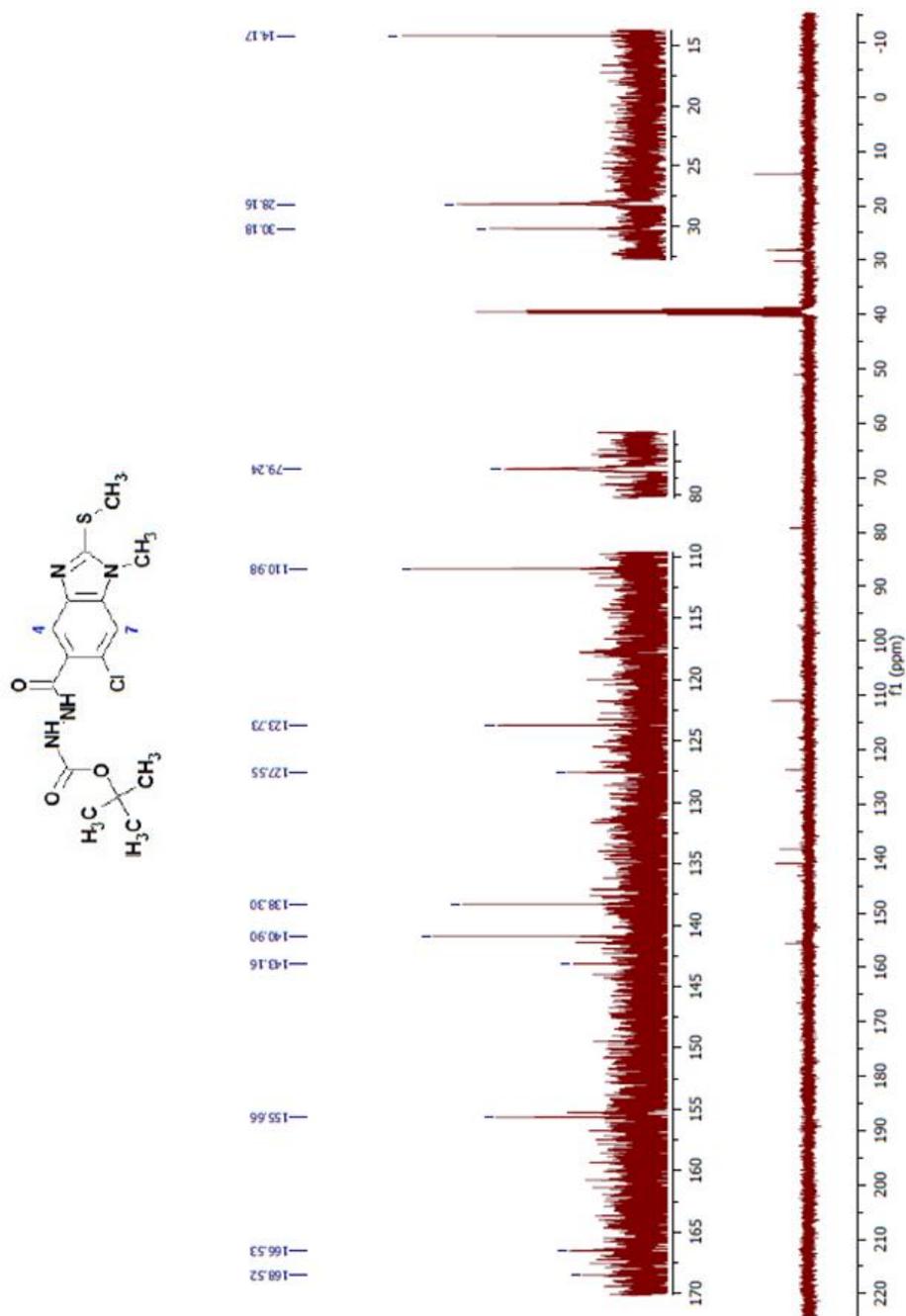
HRSM ESI: 6-cloro-*N*-(6-cloropridin-2-il)-1-metil-2-(metilitio)-1-*H*-bencimidazol-5-carboxamida (**PYP3**).



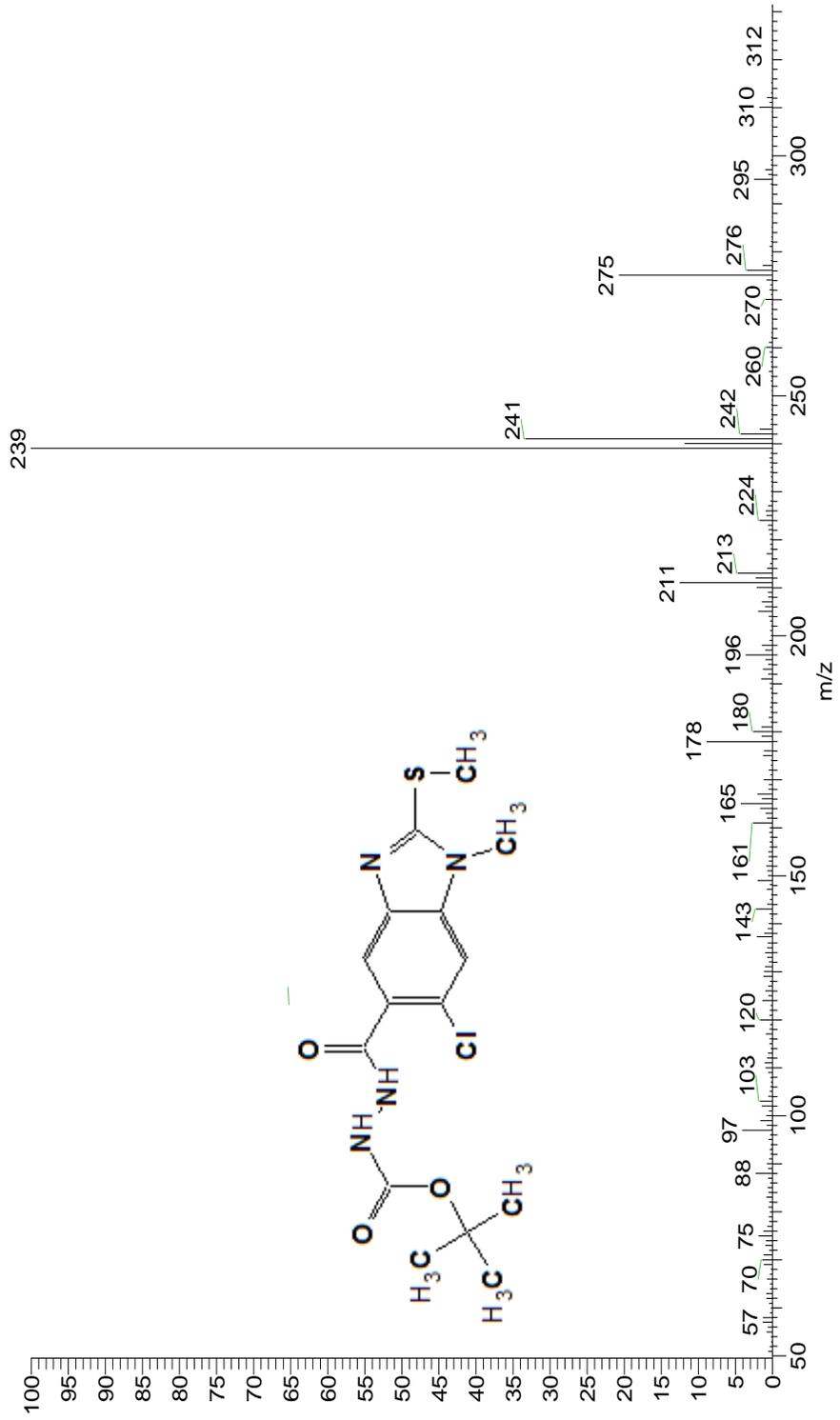
Espectro 40, IR: FTIR reflectancia cm⁻¹: tert-butil 2-((6-cloro-1-metil-2-(metilto)-1H-bencimidazol-5-il)carbonil)hidracinacarboxilato (PYP4)



Espectro 41, RMN¹H. (TMS, DMSO-d₆) ppm: 2-[[6-cloro-1-metil-2-(metilitio)-1H-benzimidazol-5-il]carbonil]hidrazincarboxilato de tert-butilo (PYP4)



Espectro 42.RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 300 MHz)ppm:2-([6-cloro-1-metil-2-(metilitio)-5-il]carbonil)imidrazincarboxilato de tert-butilo (PYP4)



Espectro 43, EM. (IE/ID) m/z: 2-[[6-cloro-1-metil-2-(metilto)-1H-benzimidazol-5-il]hidracina carboxilato de *tert*-butilo (PYP4)

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 100.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off

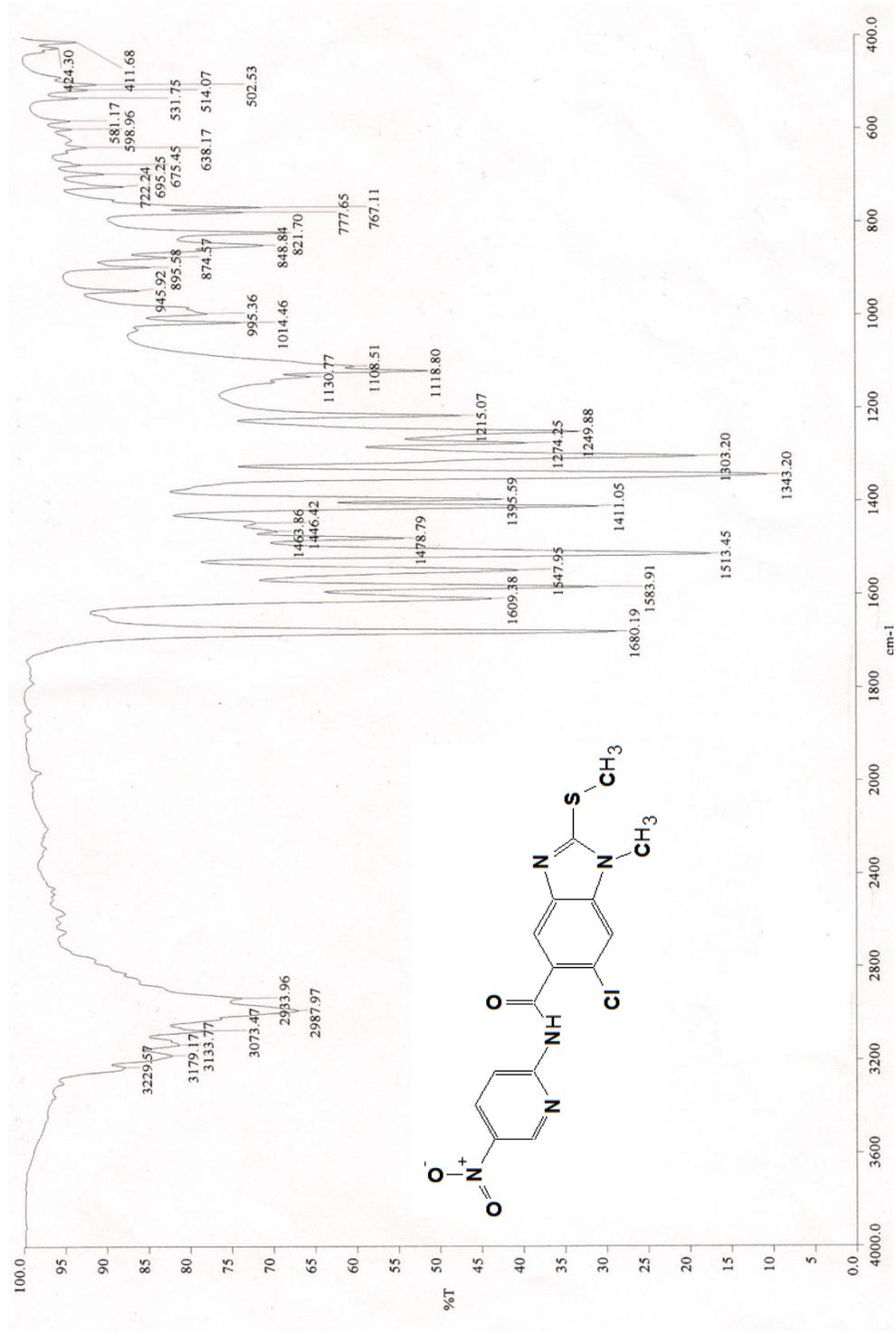
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

32 formula(e) evaluated with 5 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)
 Elements Used:

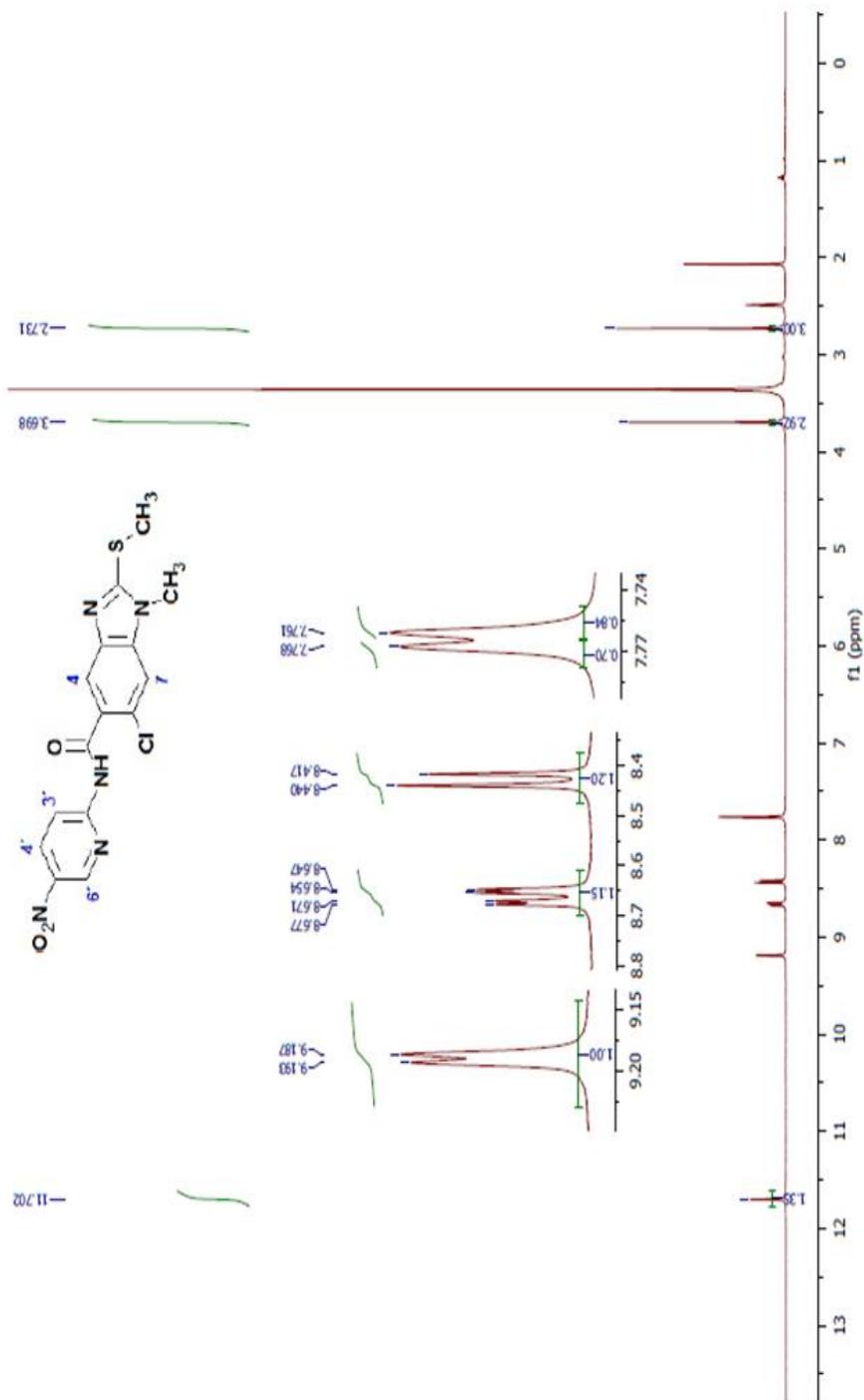
C: 15-20 H: 13-22 N: 3-5 O: 0-3 S: 1-1 Cl: 0-3

Minimum:									
Maximum:									
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula				
371.0963	371.0945	1.8	4.9	7.5	C15 H20 N4 O3 S Cl				
	371.0864	9.9	26.7	7.5	C16 H21 N4 S Cl2				
	371.1097	-13.4	-36.1	11.5	C19 H20 N4 S Cl				
	371.1178	-21.5	-57.9	11.5	C18 H19 N4 O3 S				
	371.0733	23.0	62.0	12.5	C18 H16 N4 O S Cl				

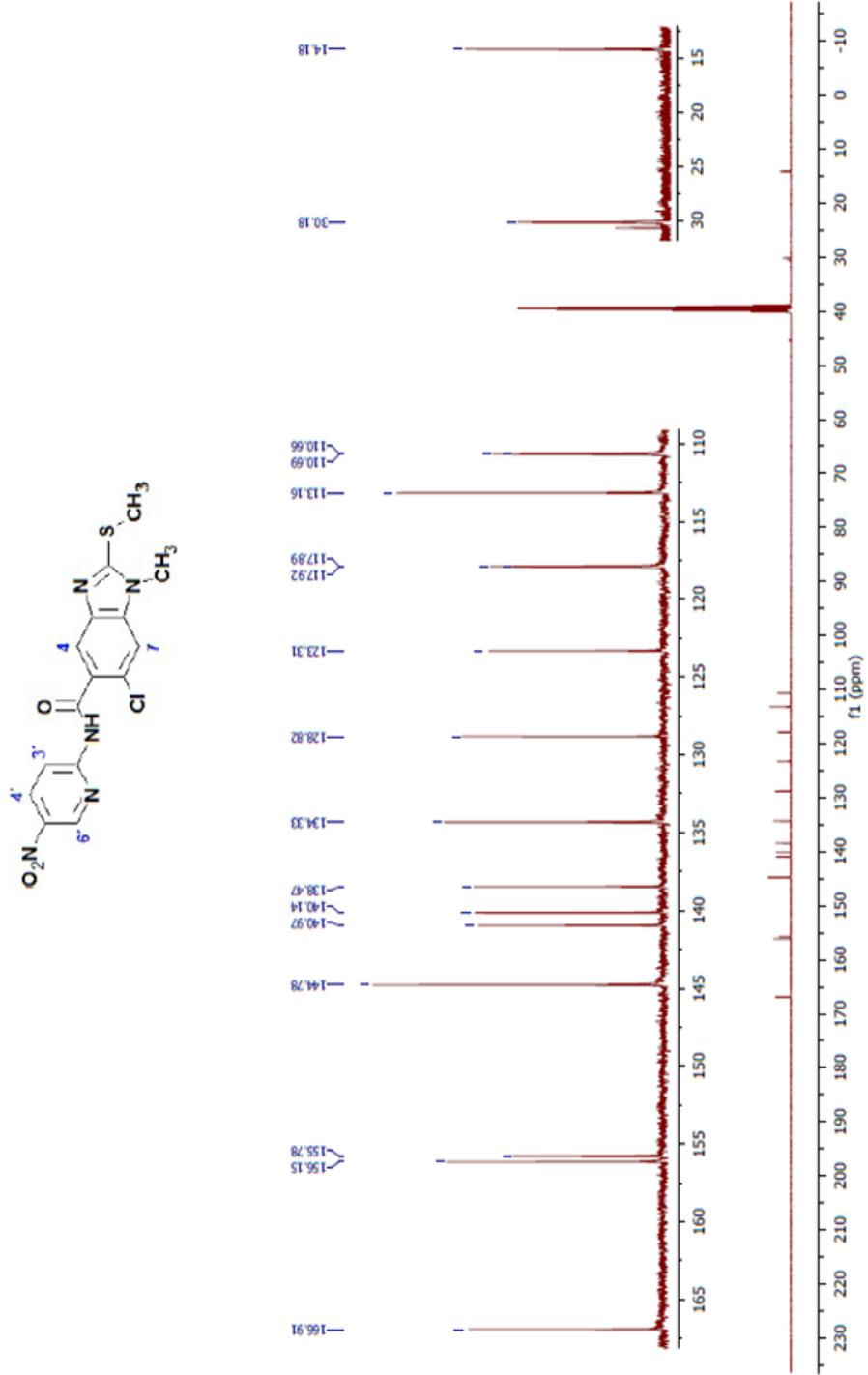
HRSM ESI: *tert*-butil 2-[[6-cloro-1-metil-2-(metilio)-1*H*-bencimidazol-5-il]hidracina carboxilato de *tert*-butilo (**PYP4**)



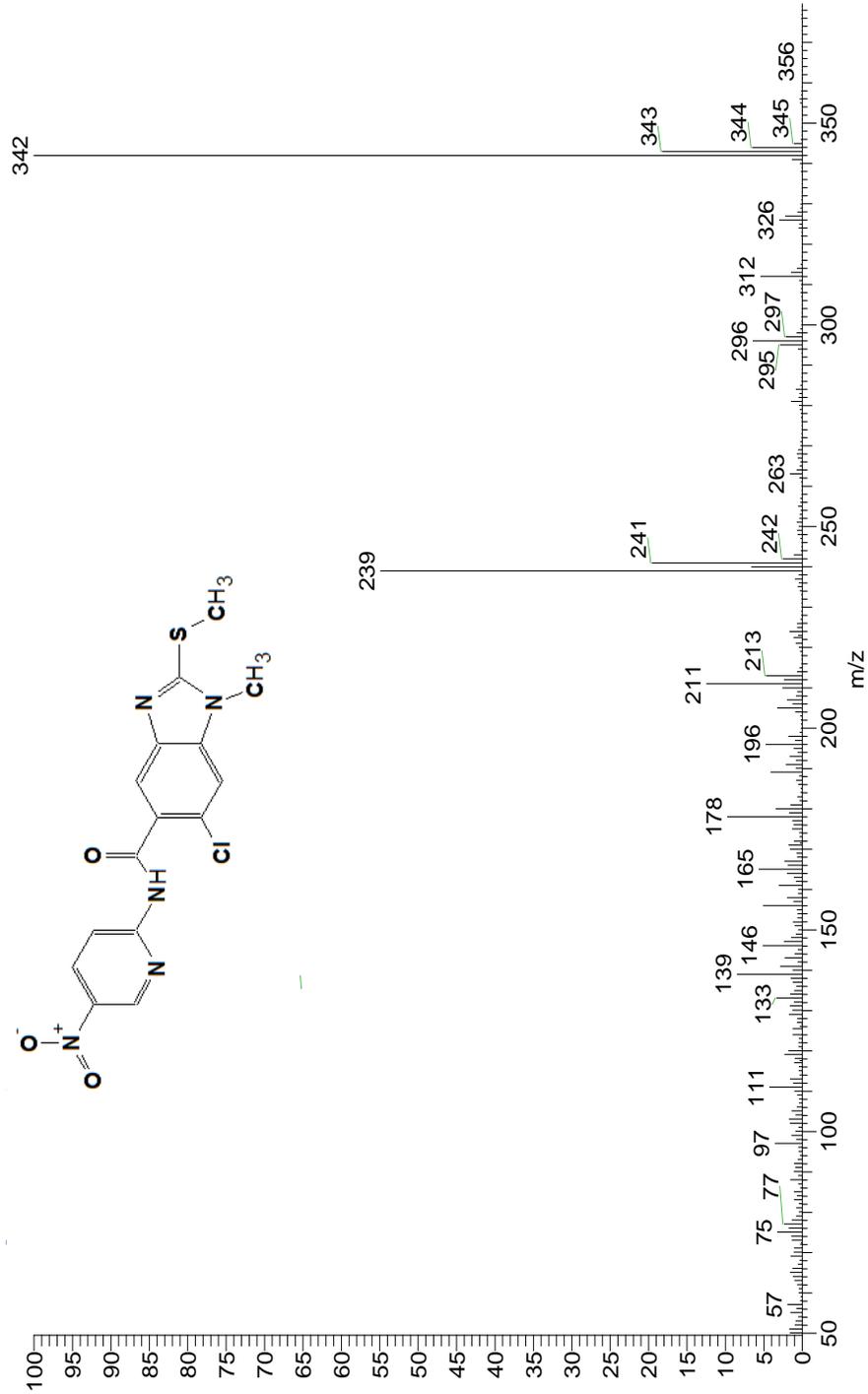
Espectro 44, IR: FTIR reflectancia cm^{-1} : 6-cloro-1-metil-2-(metil)-*N*-(5-nitropiridin-2-il)-1*H*-benzimidazol-5-carboxamida (PYP5)



Espectro 45. RMN¹H. (TMS, DMSO-*d*₆) ppm: 6-cloro-1-metil-2-(metilfio)-N-(5-nitropiridin-2-il)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (PYP5)



Espectro 46. RMN¹³C. (TMS. DMSO-d₆ 400 MHz) ppm: 6-cloro-1-metil-2-(metilitio)-N-(5-nitropiridin-2-il)-1H-benzimidazol-5-carboxamida (PYP5)



Espectro 47, EM. (IE/ID) *m/z*: 6-cloro-1-metil-2-(metil-5-nitropiridin-2-il)-1H-benzimidazol-5-carboxamida (PYP5)

Elemental Composition Report

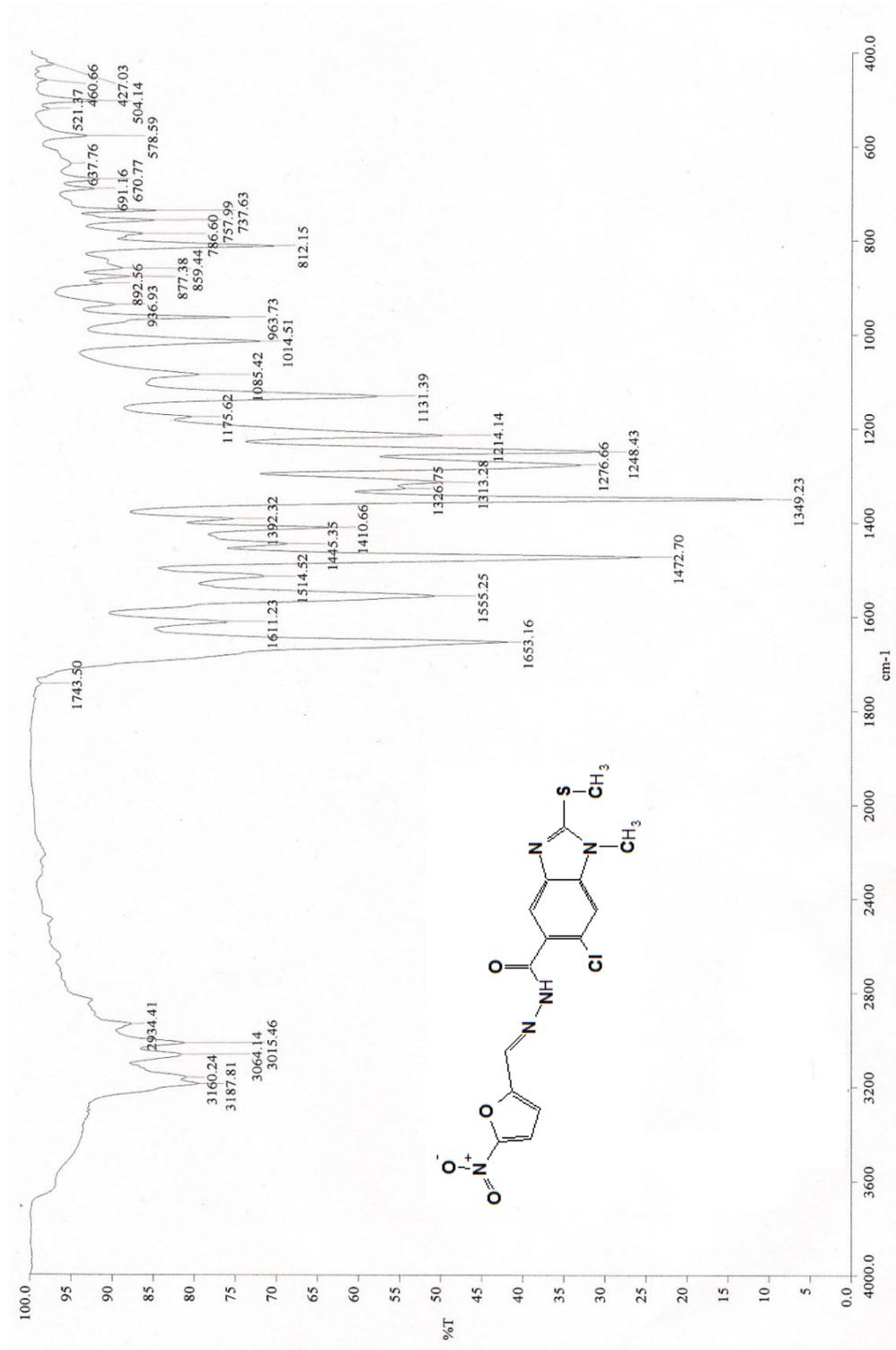
Single Mass Analysis

Tolerance = 100.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off

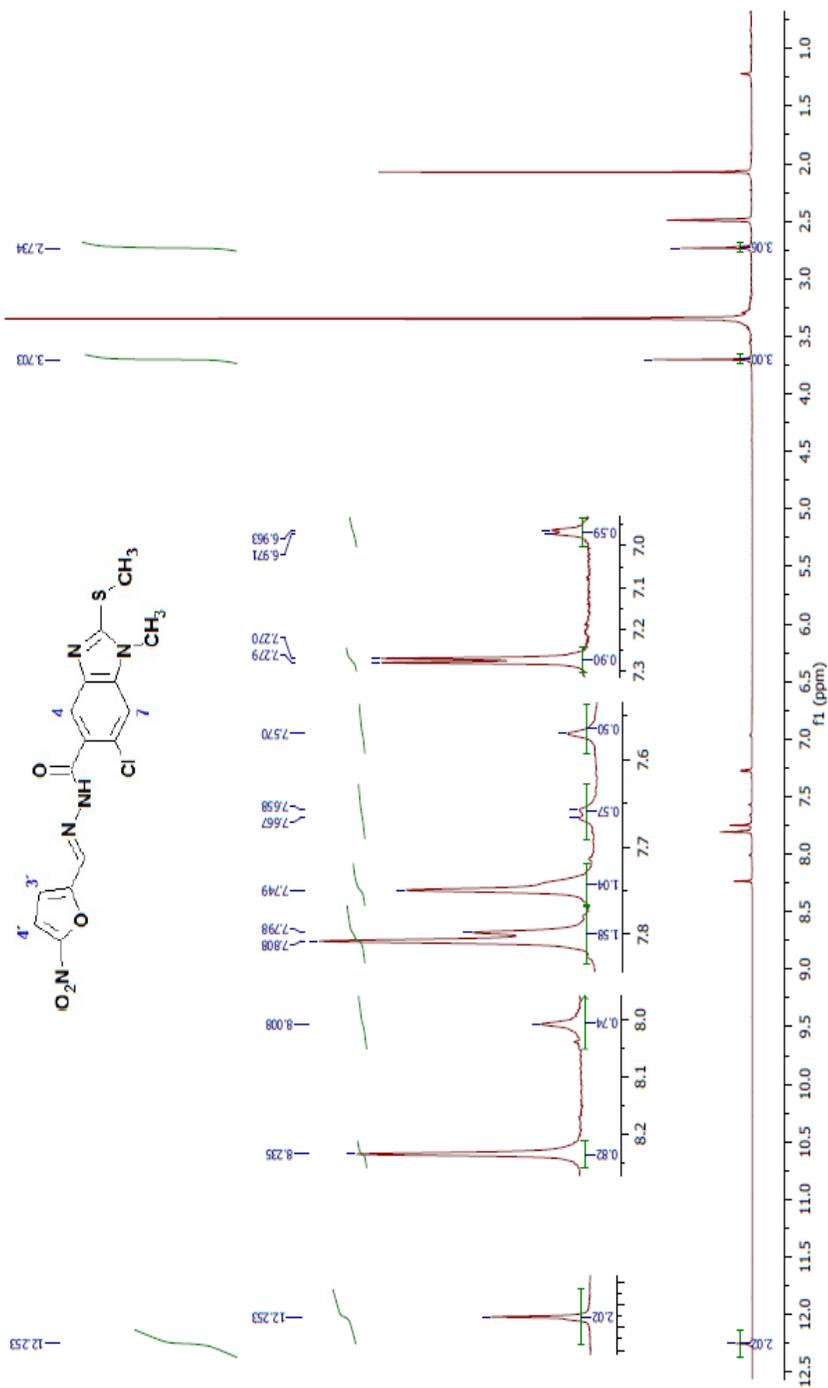
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 14 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)
 Elements Used:
 C: 13-16 H: 8-13 N: 3-5 O: 1-3 S: 1-1 Cl: 0-2

Minimum:	30.0	100.0	-1.5		
Maximum:			50.0		
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
378.0415	378.0428	-1.3	-3.4	11.5	C15 H13 N5 O3 S Cl

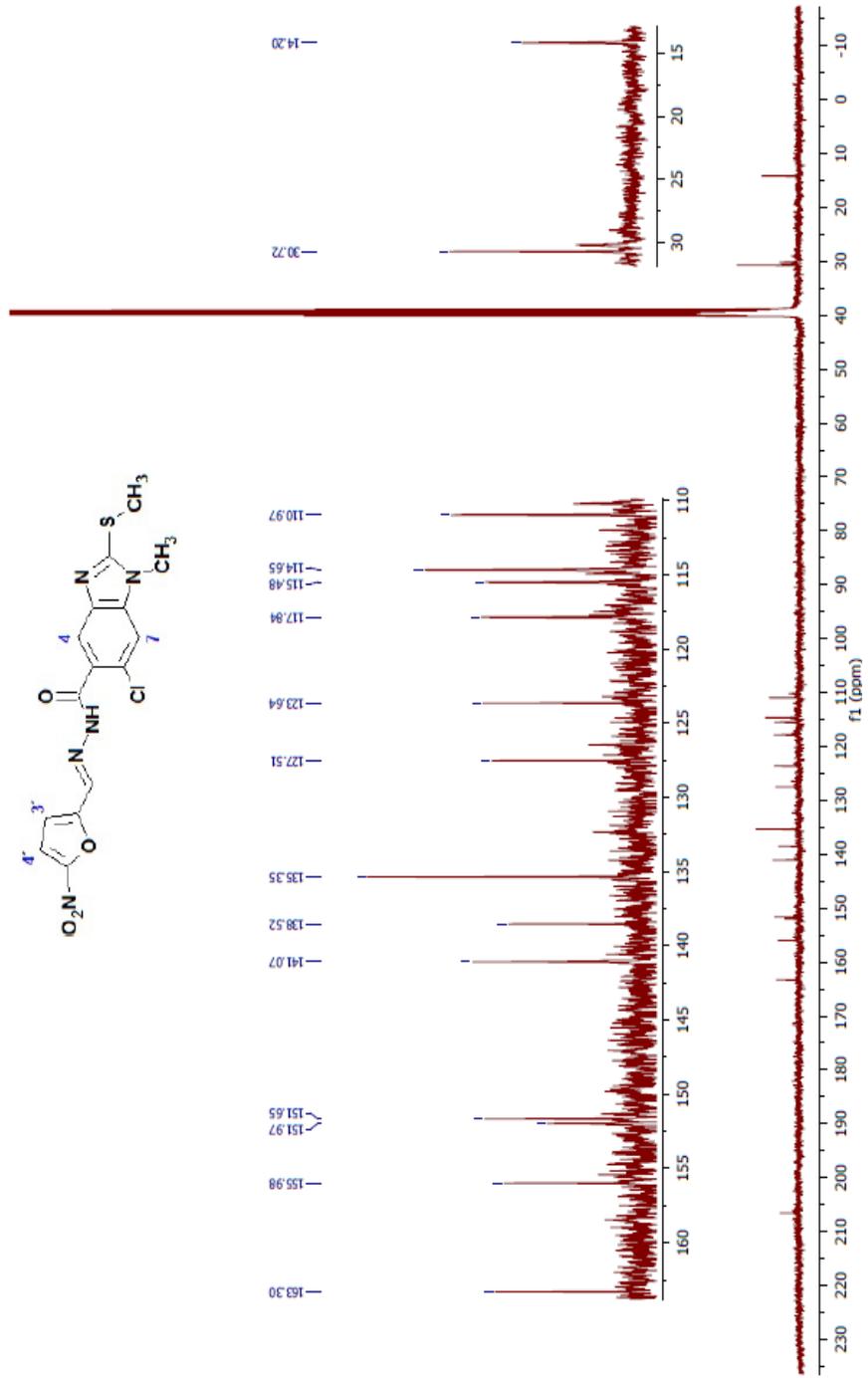
HRSM ESI: 6-cloro-1-metil-2-(metilitio)-N-(5-nitropiridin-2-il)-1H-bencimidazol-5-carboxamida (PYP5)



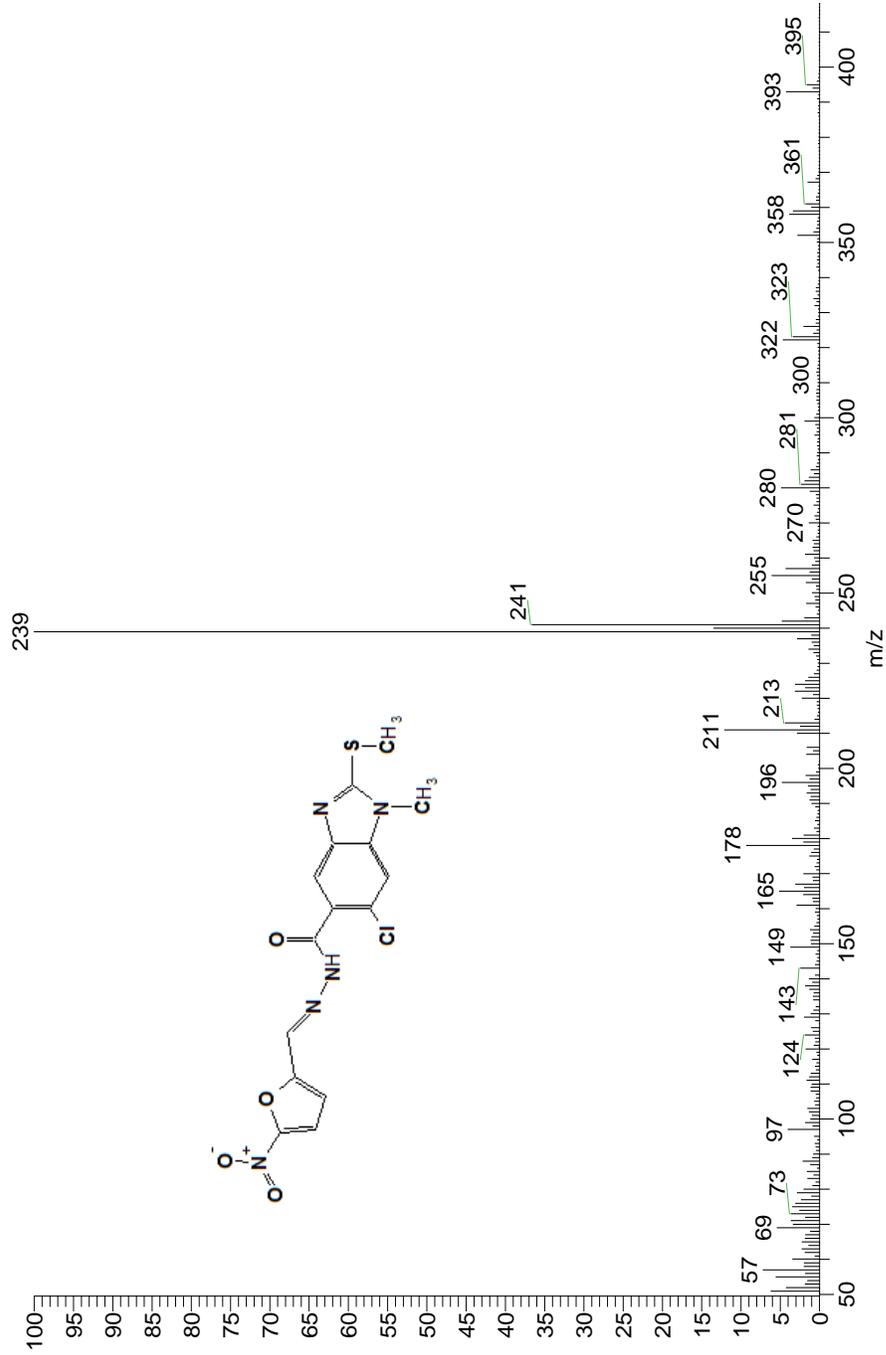
Espectro 48, IR: FTIR reflectancia cm⁻¹: 6-cloro-1-metil-2-(metilito)-N-[(5-nitrofurán-2-il)metilideno]-1H-benzimidazol-5-carbohidracida (PYP7)



Espectro 49, RMN¹H. (400 MHz, DMSO-d₆) ppm::6-cloro-1-metil-2-(metilitio)-N-[(5-nitrofurán-2-il)metilideno]-1H-bencimidazol-5-carbohidracida (PYP7)



Espectro 50. RMN¹³C. (DMSO-*d*₆ 400 MHz) ppm6-cloro-1-metil-2-(metilio)-N-[(5-nitrofurano-2-il)metilideno]-1*H*-bencimidazol-5-carbohidracida (PYP7)



Espectro 51, EM. (IE/ID) *m/z*:6-cloro-1-metil-2-(metilitio)-*N*-[(5-nitrofurano-2-il)metilideno]-1*H*-benzimidazol-5-carbohidracida (PYP7)

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 100.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 16 formula(e) evaluated with 3 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)
 Elements Used:
 C: 13-16 H: 8-13 N: 3-6 O: 3-5 S: 1-1 Cl: 0-2

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula
394.0366	394.0377	-1.1	-2.8	11.5	C15 H13 N5 O4 S Cl
	394.0264	10.2	25.9	11.5	C16 H13 N3 O5 S Cl
	394.0013	35.3	89.6	12.5	C14 H9 N5 O5 S Cl

Minimum: -1.5
 Maximum: 50.0

HRSM ESI:6-cloro-1-metil-2-(metilitio)-N-(5-nitropiridin-2-il)-1-H-bencimidazol-5-carboxamida (PYP7)